

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JEAN SANTOS MACHADO

MICROPROPAGAÇÃO DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O.
Berg – MYRTACEAE) POR MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES E
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

CURITIBA

2018

JEAN SANTOS MACHADO

MICROPROPAGAÇÃO DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O.
Berg – MYRTACEAE) POR MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES E
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Dissertação apresentada como requisito final
à obtenção do título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Botânica, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marguerite Quoirin

Co-orientadores: Dr Fabiano Rodrigo da Maia,
Dr^a Juliana Degenhardt-Goldbach, Prof^a Dr^a
Patrícia Carla Giloni de Lima

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Machado, Jean Santos

Micropropagação de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg – Myrtaceae) por multiplicação de gemas axilares e embriogênese somática. / Jean Santos Machado. – Curitiba, 2018.
149 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Marguerite Quoirin

Co-orientador: Fabiano Rodrigo da Maia

Co-orientadora: Juliana Degenhardt-Goldbach

Co-orientadora: Patrícia Carla Giloni de Lima

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Árvores frutíferas. 2. Clorofila. 3. Myrtaceae. I. Título II. Quoirin, Marguerite. III. Maia, Fabiano Rodrigo da. IV. Degenhardt-Goldbach, Juliana. V. Lima, Patrícia Carla Giloni de. VI. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (20. ed.) 581.16

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Botânica



MICROPROPAGAÇÃO DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg –
MYRTACEAE) POR MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES E EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA ”

por

JEAN SANTOS MACHADO

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos doutores

Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin

Neusa Steiner

Luciana Lopes Fortes Ribas

Curitiba, 27 de abril de 2018.

AGRADECIMENTOS

A todas as Divindades e seres de luz, pelas bênçãos, proteção, por iluminarem, guiarem e colocarem pessoas maravilhosas no meu caminho;

Aos meus amados pais Sirlei e Ernâni Machado, meus avós Edite e José Machado, minha tia-avó Rosa Lisboa (*in memoriam*) e demais parentes, pelo apoio, compreensão e incentivo de sempre;

A Professora Dr^a. Marguerite Quoirin, pela orientação, aprendizado e atenção;

A Professora Dr^a. Patrícia Carla Giloni de Lima, pela co-orientação que apesar da distância esteve sempre presente, disposta e pelo auxílio nos estudos de potencial fotossintético;

Ao Dr. Fabiano Rodrigo da Maia pela co-orientação, auxílio nas análises estatísticas, pelos conselhos e pela amizade;

A Universidade Federal do Paraná, pela infraestrutura;

Ao Departamento de Botânica e ao Programa de Pós-graduação em Botânica em especial aos professores Drs. Gedir de O. Santos, Hugo P. F. Fraga, Luciana L. F. Ribas, Thelma A. V. Ludwig e a técnica do laboratório de fisiologia vegetal Marilina A. Gionedis, pelo auxílio, conselhos e ensinamentos;

A Duane Lima, pela identificação taxonômica do material vegetal e a equipe do Herbário da UFPR – UPCB, pelo auxílio no tombamento do mesmo;

Aos colegas de laboratório, Éder Queiroz, Fabrícia Lorrane, Franciele Koene, Julio Amatuzzi, Sheila Silveira pelo auxílio, parceria e descontração; E em especial, a Rodrigo Cordeiro por fornecer os frutos utilizados nesta pesquisa;

Aos amigos e colegas da botânica, em especial a Patrícia Ferreira, Milena Santos, Fernanda Pieczak, Jéssica de Jesus, Nicolás Morales, Miguel Machnicki, Luan Passos, Amabilly Bohn, Andrey Cardozo, Ana Paula Cardozo, Daniela Imig, José Juski, Laura de Lannoy, Mauricio Nunes, Mônica Bolson, Sthaylanny Flaviano, Thiago dos Santos e Thuane Bochorney, pelos conselhos, conversas, descontrações e risadas que fizeram desta experiência mais alegre e divertida;

Aos amigos que Curitiba me proporcionou, Camila Sampaio, Gabriela Gelinski, Luana Viana, Naiana Malheiros e Kellen Kujaswi, pelas conversas e parceria;

A Jefferson Adir Alves, pelo amparo, compreensão, sábios conselhos, confiança, paciência e por todo o companheirismo que foi fundamental para manter-me motivado e concluir esta fase;

A CAPES pela bolsa concedida.

***“No tear que tece a nossa vida não há pontas soltas,
todos os fios estão entremeados entre si
e revestidos de significados.”***

Yuuko Ichihara

RESUMO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), conhecida como guabirobeira, é uma árvore nativa da Mata Atlântica e Cerrado. Possui potencial medicinal e frutífero, porém suas sementes são recalcitrantes e isto dificulta sua propagação. A micropropagação pode ser utilizada para assegurar a produção de mudas em larga escala. Este trabalho teve como objetivo a elaboração de um protocolo de micropropagação por proliferação de gemas axilares e por embriogênese somática, bem como analisar o potencial fotossintético de mudas de guabirobeira cultivadas em diferentes condições. Para iniciar as culturas, foram utilizadas plantas jovens de guabirobeira cultivadas *in vitro* obtidas de sementes. Os meios de cultura MS, LPm, QL e WPM e o biocida Plant Preservative Mixture[®] foram testados para o estabelecimento das culturas assépticas. Nesta etapa, o meio WPM suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) permitiu melhor desenvolvimento dos explantes e o biocida foi eficaz para o controle das contaminações sem efeito fitotóxico. Na multiplicação dos segmentos nodais, foram testados os meios MS e WPM e as citocininas 2-iP, BAP, cinetina e zeatina. Houve formação de novos brotos em todos os tratamentos e o meio WPM suplementado com 2,2 μM de BAP forneceu o maior número médio de brotos novos por segmento nodal (3,02) após três subcultivos. A formação de raízes em miniestacas foi observada no meio WPM suplementado ou não com ácido indolbutírico (AIB), com 70% de enraizamento em 24,5 μM de AIB após 60 dias. As mudas transplantadas em caixa plástica contendo mistura de substratos Plantmax[®] e vermiculita Dimy[®] (1:1 v/v) apresentaram 57% de sobrevivência após 60 dias de aclimatização. As plantas cultivadas *in vitro* tiveram os teores de clorofilas, carotenoides e todos os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* menores em relação às plantas cultivadas *ex vitro* em casa de vegetação bem como às aclimatizadas. Experimentos de embriogênese somática foram realizados a partir de discos foliares e de embriões zigóticos maduros. Ambos os explantes formaram calos quando cultivados na presença de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Embriões somáticos assincrônicos foram obtidos apenas a partir de embriões zigóticos, com maior frequência nos estádios torpedo e cotiledonar e surgiram após 180 dias de cultivo em meio WPM adicionado de 7,5 μM de 2,4-D. Assim, foi desenvolvido um protocolo completo de micropropagação da guabirobeira a partir de segmentos nodais. Além disso, foi possível obter embriões somáticos em todos os estádios ontogenéticos e plantas normais. Novos estudos são necessários para obter taxas de multiplicação mais elevadas e aperfeiçoar o processo de embriogênese somática.

Palavras-chave: Árvore frutífera, cultura de tecidos vegetais, fluorescência da clorofila *a*, Myrtaceae, *Plant Preservative Mixture*.

ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), popularly known as guabirobeira, is a species native to Brazil, encountered in the Atlantic Forest and Savanna. It has potential as medicinal plant and fruit tree, but its seeds are recalcitrant, which hinders its propagation. In this context, micropropagation can be used to propagate it on a large scale. The aim of this study was the elaboration of a protocol of micropropagation by proliferation of axillary buds and somatic embryogenesis of guabirobeira, as well as to analyze the efficiency of the photosynthesis in the acclimatized plants. For this, young plants of guabirobeira cultivated *in vitro* and seeds collected in the field were used. Different nutrient media (MS, LPm, QL and WPM) and cytokinins were tested for multiplication from nodal segments. Cultures were maintained in a growth room under controlled light and temperature. The formation of new shoots occurred in all tested treatments and the WPM medium supplemented with 2.2 μM 6-benzyladenine (BA) produced the highest average number of shoots (3.02) after three subcultures. Root formation was observed when minicuttings were cultured in WPM medium supplemented or not with indolebutyric acid (IBA), with a maximum rooting rate of 70% in 24.5 μM IBA. During acclimatization in a plastic box, 57% of the plantlets survived after 45 days in a mixture of Plantmax® substrate and vermiculite (1:1 v/v). The plants cultivated *in vitro* had lower levels of chlorophylls and carotenoids in comparison with *ex vitro* and acclimatized plants. Somatic embryogenesis experiments were initiated from leaf discs and mature zygotic embryos. Both types of explants formed callus when grown in WPM medium supplemented with 2.5 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Somatic embryos were formed in different stages (mainly torpedo and cotyledon) in the embryogenesis masses obtained from zygotic embryos maintained for 180 days of culture in WPM medium supplemented with 7.5 μM of this auxin. In conclusion, a complete micropropagation protocol of guabirobeira from nodal segments was developed. Moreover it was possible to obtain somatic embryos in all stages of development but few of them were converted into plantlets. New studies are needed to obtain a higher multiplication rate by proliferation of axillary buds and to improve the somatic embryogenesis process.

Key words: Chlorophyll *a* fluorescence, fruit tree, Myrtaceae, plant tissue culture, Plant Preservative Mixture™.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D - 2,4-Diclorofenoxiacético

2-iP - 2-isopenteniladenina

AIB - Ácido Indol-butírico

ANA - Ácido Naftaleno-acético

BAP - 6-Benzilaminopurina

ES: Embriões somáticos

EZI - Embriões zigóticos imaturos

EZM - Embriões zigóticos maduros

GL - Graus de liberdade

GLM - Modelos lineares generalizados

KIN - Cinetina

NMB - Número médio de brotos

PFPD – Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos

PIC - Picloram

PPM™ - Plant Preservative Mixture™

PSII - Fotossistema dois

SC – Subcultivo(s)

SFB - Segmentos formando brotos

TDZ - Tidianuron

ZEA – Zeatina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 MYRTACEAE	18
2.2 A GUABIROBEIRA.....	19
2.3 MICROPROPAGAÇÃO	20
2.3.1 CONCEITOS GERAIS.....	20
2.3.2 MEIOS DE CULTURA	21
2.3.3 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS, ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO	22
2.3.4 MICROPROPAGAÇÃO EM MYRTACEAE	23
2.3.5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	24
2.3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MYRTACEAE	27
2.4 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM PLANTAS MICROPROPAGADAS	28
2.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 1	37
MICROPROPAGAÇÃO DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia</i> <i>xanthocarpa</i> O. Berg – MYRTACEAE) A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	40
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos.....	41

3.	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE ESTUDO	42
3.2	MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	42
3.3	ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	43
3.4	MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES	43
3.4.1	MEIOS DE CULTURA E BAP	43
3.4.2	CITOCININAS	44
3.5	ENRAIZAMENTO	45
3.6	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS	46
3.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4.	RESULTADOS	48
4.1	ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	48
4.2	INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	50
4.2.1	EFEITO DA FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E DO BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	50
4.2.2	EFEITO DAS CITOCININAS	55
4.3	ENRAIZAMENTO	63
4.4	ACLIMATIZAÇÃO	68
5.	DISCUSSÃO	72
5.1	ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i>	72
5.2	INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	73
5.2.1	EFEITO DA FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E DO BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS	73
5.2.2	EFEITO DAS CITOCININAS	74
5.3	ENRAIZAMENTO	76
5.4	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS	78
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	81

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
CAPÍTULO 2	86
ANÁLISE DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg – MYRTACEAE)	86
RESUMO	87
ABSTRACT	88
1. INTRODUÇÃO	89
2. OBJETIVOS	90
2.1 Objetivo geral	90
2.2 Objetivos específicos	90
3. MATERIAIS E MÉTODOS	90
3.1 MATERIAL VEGETAL	90
3.2 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS	91
3.3 ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A	92
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	92
4. RESULTADOS	93
4.1 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS	93
4.2 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A	94
5. DISCUSSÃO	98
5.1 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS	98
5.2 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A	100
6. CONCLUSÃO	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
CAPÍTULO 3	107
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg - MYRTACEAE)	107

RESUMO	108
ABSTRACT	109
1. INTRODUÇÃO	110
2. OBJETIVOS	111
2.1 Objetivo geral	111
2.2 Objetivos específicos.....	111
3. MATERIAIS E MÉTODOS	112
3.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE ESTUDO	112
3.2 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES	112
3.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	113
3.4 FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS.....	113
3.4.1 A PARTIR DE DISCOS FOLIARES.....	113
3.4.2 MANUTENÇÃO DE CALOS	114
3.4.3 A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS.....	114
3.5 FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E CONVERSÃO	114
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	115
4. RESULTADOS.....	116
4.1 DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES.....	116
4.2 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES.....	116
4.3 FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS	122
4.4 FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E CONVERSÃO EM PLANTAS	124
5. DISCUSSÃO	126
5.1 DESINFESTAÇÃO	126
5.2 FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS.....	126
5.2.1 EXPLANTES	127

5.2.2 PICLORAM E 2,4-D.....	128
5.3 EMBRIÕES SOMÁTICOS	130
5.4 CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PLANTAS.....	131
6. CONCLUSÕES	132
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
REFERÊNCIAS.....	137
ANEXO 1 – CONCENTRAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA (mg.L⁻¹)	147
ANEXO 2 – CONCENTRAÇÃO DE VITAMINAS E COMPOSTOS ORGÂNICOS EM DOIS MEIOS DE CULTURA, EXPRESSA EM mg.L⁻¹	148
ANEXO 3 - SCRIPTS PARA MODELOS LINEARES GENERALIZADOS (GLM).....	149

1. INTRODUÇÃO GERAL

Campomanesia xanthocarpa O. Berg é uma espécie pertencente a família Myrtaceae, popularmente conhecida como guabiroba, guavira, guavirova, entre outros; nativa do Brasil, ocorre nos Biomas Cerrado e Mata Atlântica (SOBRAL *et al.*, 2016). A espécie apresenta potencial para ser utilizada medicinalmente no tratamento de tuberculose (PAVAN *et al.*, 2009) e no combate ao diabetes (VIECELI *et al.*, 2014). A guabirobeira é utilizada por moradores locais como fonte de lenha e para a produção de geleias, sucos, doces e licores a partir dos seus frutos que possuem um sabor adocicado (ALMEIDA, 1998).

As sementes da guabirobeira são classificadas como recalcitrantes, ou seja, são intolerantes a dessecação e não sobrevivem muito tempo após serem retiradas dos frutos. Este fato impossibilita seu armazenamento e dificulta seu plantio, que deve ocorrer logo após a retirada das sementes; consequentemente, isso cria um obstáculo para a propagação da espécie em ambiente natural (MELCHIOR *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos são desenvolvidos com o objetivo de propagar vegetativamente espécies com importância econômica e/ou nativas (UNEMOTO *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2010; MALDONADO-MAGAÑA *et al.*, 2015). Atualmente, não existe protocolo completo e eficiente visando à propagação vegetativa da guabirobeira. Apenas foi encontrado um trabalho com resultados preliminares (SCUTTI e ZANETTE, 2000) que mostram a dificuldade na obtenção de estacas enraizadas e problemas da micropropagação nas fases de desinfestação e enraizamento dos explantes.

A micropropagação consiste em um conjunto de técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* que visam à propagação vegetativa de plantas (GEORGE *et al.*, 2008). Dentre estas técnicas podem ser citadas a multiplicação de gemas axilares e a embriogênese somática.

Plantas micropropagadas geralmente apresentam características anatômicas e fisiológicas diferentes de plantas da mesma espécie que não passaram pelo processo de micropropagação (POSPISILOVÁ *et al.*, 1999). É o caso das características fotossintéticas: em plantas micropropagadas (durante o processo *in vitro* e na aclimatização), as taxas fotossintéticas bem como os teores de clorofilas e demais pigmentos tendem a variar em relação às plantas cultivadas em campo.

Estudos de micropropagação em indivíduos pertencentes às Myrtaceae ainda são escassos, mas apontam para resultados satisfatórios na elaboração de protocolos, desenvolvimento das culturas e regeneração de plantas, bem como na obtenção de plantas micropropagadas (NASCIMENTO *et al.*, 2008; ROSS e GRASSO, 2011; SILVA *et al.*, 2014)

Tendo em vista a dificuldade de sua propagação por sementes e por macropropagação, a micropropagação pode ser uma ferramenta capaz de auxiliar na produção de novas mudas e na propagação dessa espécie. Assim, o presente trabalho tem como objetivo a obtenção de um protocolo completo de micropropagação de guabirobeira por multiplicação de gemas axilares e por embriogênese somática para contribuir com a produção e propagação dessa espécie, além de investigar a fotossíntese das plantas obtidas por micropropagação e comparar com plantas não micropropagadas.

Este trabalho foi dividido em três capítulos abordando técnicas diferentes de micropropagação da guabirobeira e análises complementares das plantas micropropagadas visando a caracterização da fotossíntese destas plantas. No primeiro, foi desenvolvido um protocolo completo de micropropagação de *C. xanthocarpa* a partir da multiplicação de gemas axilares utilizando segmentos nodais. Foram realizados diferentes experimentos para determinar a melhor formulação de meio de cultura que permitisse o melhor estabelecimento e desenvolvimento dos explantes *in vitro*, bem com as melhores condições para a aclimatização das mudas micropropagadas.

No segundo, foram quantificados os pigmentos fotossintéticos e analisada a fluorescência da clorofila *a* das plantas aclimatizadas obtidas a

partir do protocolo desenvolvido no capítulo anterior. O potencial fotossintético destas plantas foi comparado com o das plantas germinadas e cultivadas *in vitro* bem como em casa de vegetação.

O terceiro capítulo descreve experimentos de embriogênese somática onde foram testados diferentes explantes, meios de cultura, tipos e concentrações de reguladores vegetais para a obtenção de massas embriogênicas e embriões somáticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MYRTACEAE

A família Myrtaceae é considerada taxonomicamente uma das mais complexas das angiospermas. Possui distribuição tropical e sub-tropical com concentração neotropical e no continente australiano. Devido a essa complexidade, bem como à dificuldade da sua taxonomia, o número de espécies varia entre os autores. Existem cerca de 4.000 espécies, organizadas em 130 gêneros (SOUZA e LORENZI 2012) e 5.800, distribuídas em 140 gêneros (GOVAERTS *et al.*, 2011).

No Brasil são encontrados 23 gêneros com 4.791 espécies; destas, 791 são endêmicas com distribuição por todo o território brasileiro e maior representatividade nos biomas Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (SOBRAL *et al.* 2016). Myrtaceae também está entre as dez famílias da flora brasileira mais ameaçadas de extinção, com 927 espécies na lista vermelha, totalizando 8,52% das espécies descritas até 2013 (PROENÇA *et al.* 2013).

Muitas espécies são utilizadas como plantas medicinais no combate à diversas doenças (ALVES *et al.* 2007). Algumas possuem valor ornamental (*Myrtus* sp), outras florestal, como no caso do *Eucalyptus* spp, que tem um rápido crescimento e é amplamente cultivado para obtenção de carvão, madeira e celulose; ou ainda, são frutíferas como a goiabeira e muitas consideradas frutas silvestres, como a jabuticabeira e guabirobeira, que são utilizadas na alimentação, porém ainda não possuem cultivo especializado e comércio em grandes proporções (SOUZA e LORENZI, 2012).

As espécies frutíferas consideradas como silvestres são encontradas nas vegetações nativas do Brasil e possuem potencial econômico que pode ser mais valorizado e investigado. Como exemplos de aplicações comerciais destes frutos, pode-se citar o seu uso como matéria prima para a produção de licores, geleias, doces e até mesmo o próprio consumo *in natura* (ALMEIDA *et al.*, 2008).

2.2 A GUABIROBEIRA

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), popularmente chamada de guabiroba, possui porte arbustivo ou arbóreo, folhas opostas, flores com hipanto branco, recoberto por tricomas, raramente glabra, poliestêmona, monoica, frutos alaranjados, globosos, lisos ou com tricomas, antese de julho a fevereiro e frutos de agosto a janeiro (LIMA *et al.*, 2011). Ocorre do Rio Grande do Sul até Minas Gerais, com disjunções para o Paraguai e Argentina. No Paraná é encontrada nas Florestas Ombrófila Mista, Densa e Semidecidual, bem como no Estepo e em vegetação secundária (LIMA *et al.*, 2011).

Considerada medicinal, esta espécie é utilizada na cultura popular para tratamentos de tuberculose (PAVAN *et al.*, 2009), no emagrecimento (BIAVATTI *et al.*, 2004), diarreias (MOREIRA *et al.*, 2011), como anti-inflamatória, anti-oxidante e com crescente interesse nas pesquisas para o combate ao diabetes (KLAFKE *et al.*, 2010; VINAGRE *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; VIECELI *et al.*, 2014).

De uma forma extrativista, a guabirobeira é utilizada por moradores locais como fonte de lenha e de frutos para consumo *in natura*, produção de geleias, sucos, doces e licores (ALMEIDA, 1998). As sementes desta espécie são recalcitrantes, ou seja, são intolerantes a dessecação e não podem ser armazenadas por longos períodos. Esta característica ecofisiológica torna inviável o armazenamento e constitui uma grande dificuldade para a propagação dessa espécie (MELCHIOR *et al.*, 2006). Atualmente, não existem protocolos completos de propagação vegetativa para a espécie, apenas tentativas que relataram problemas relacionados com o baixo enraizamento de estacas, contaminações das culturas, altas percentagens de oxidações e morte dos explantes (SCUTTI e ZANETTE, 2000).

2.3 MICROPROPAGAÇÃO

2.3.1 CONCEITOS GERAIS

A micropropagação é definida como um conjunto de técnicas que visa à propagação vegetativa de plantas a partir do cultivo de tecidos ou órgãos vegetais *in vitro*. Dentre estas técnicas podem ser citadas a organogênese e a embriogênese somática (GEORGE *et al.*, 2008).

As aplicações destas técnicas são numerosas. Pode-se citar o melhoramento vegetal, a propagação vegetativa massal em espaços reduzidos, o auxílio nos plantios homogêneos e a recuperação de áreas degradadas. Além disso, a micropropagação é uma alternativa econômica às técnicas tradicionais de propagação de espécies florestais nativas e para a conservação de espécies com reprodução difícil, por meio da propagação *in vitro* e do armazenamento de material biológico em bancos de germoplasma (GOLLE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

As culturas de tecidos *in vitro* são iniciadas com a desinfestação de partes vegetais selecionadas denominados explantes para a remoção superficial de microorganismos. A seguir, estes explantes são inoculados em meios nutritivos contendo macro e micronutrientes, vitaminas e fontes de carboidratos (comumente a sacarose) (GEORGE *et al.*, 2008).

O biocida PPM™ tem sido utilizado para evitar contaminações de culturas *in vitro* por microorganismos como uma alternativa ao uso de antibióticos e fungicidas convencionais (GEORGE e TRIPEPI, 2001). De acordo com os fabricantes, o PPM™ (Plant Cell Technology, Washington, D.C.) mata as células de fungos e bactérias; previne a germinação de esporos e elimina a contaminação endógena, atuando na inibição de enzimas importantes do ciclo do ácido cítrico e da cadeia transportadora de elétrons destes microorganismos. Este biocida é líquido e resistente às altas temperaturas, o que possibilita a sua autoclavagem. Além disso, não é tóxico e não prejudica os explantes no cultivo *in vitro* (GEORGE e TRIPEPI, 2001).

2.3.2 MEIOS DE CULTURA

Existem diferentes formulações de meios de cultura e, entre as mais utilizadas, está o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM “*Woody Plant Medium*” (LLOYD e McCOWN, 1980). O meio MS foi desenvolvido para culturas de calos de tabaco e tem sido comumente o mais utilizado no cultivo *in vitro* de diversas espécies vegetais (GEORGE *et al.*, 2008). O nitrogênio neste meio é fornecido em maior quantidade pelo do nitrato de amônio e de potássio. O cloro e molibidênio são encontrados em concentrações relativamente altas, enquanto que cálcio, fósforo, magnésio e cobre estão disponibilizados em níveis mais baixos (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Em contraste, o meio WPM, utilizado para plantas lenhosas, fornece nitrogênio na forma dos nitratos de amônio e cálcio que, assim como o cloro e o potássio, são disponibilizados em concentrações mais baixas. Demais diferenças são em relação ao cálcio que possui concentração mais elevada e a ausência de íons iodo e cobalto (LLOYD e McCOWN, 1980).

O meio QL foi desenvolvido para *Prunus* e apresenta concentrações semelhantes a estes dois meios, porém diferencia-se em relação as menores concentrações de manganês e cloro, maior concentração de fósforo e razão nitrato/amônio menor do que os demais (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977).

Por fim, o meio LPm foi desenvolvido primeiramente para *Pinus contorta*, assemelha-se com a formulação dos meios QL e MS, porém as concentrações de cálcio, cobre, ferro e zinco são menores, enquanto que a de potássio e a razão nitrato/amônio é maior (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1981).

2.3.3 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS, ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

Na etapa de multiplicação, os meios são suplementados com diferentes citocininas, para remover a dominância apical e promover a multiplicação das gemas axilares. Geralmente, a citocinina mais utilizada é o BAP, isoladamente ou em combinações com outras citocininas e/ou auxinas. Essa etapa compreende vários subcultivos no mesmo meio de multiplicação com o objetivo de obter maior quantidade de brotos novos (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A próxima etapa, quando necessária, é a de alongamento, onde são adicionadas giberelinas, para promover o alongamento dos brotos provenientes da fase anterior. Posteriormente, o enraizamento é a fase onde microestacas são colocadas em meios contendo auxinas para a indução de raízes adventícias. De acordo com Oliveira *et al.* (2013), este processo pode ocorrer tanto em condições *in vitro* como *ex vitro* e geralmente utiliza-se a auxina AIB para esta indução devido aos bons resultados, custo e ausência de fitotoxicidade.

Finalmente, a aclimatização é a etapa onde as plantas obtidas da micropropagação, são transferidas para condições *ex vitro* e para adaptação em ambiente completamente diferente do cultivo em que estavam (DEBERGH e READ, 1991). Para isso podem ser utilizados diferentes substratos comerciais, vermiculita, areia e/ou fibras de coco, entre outros. O controle da umidade relativa do ar da casa de vegetação pode ser feito por meio de coberturas com filme plástico de polietileno, nebulização frequente e sombrite (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.3.4 MICROPROPAGAÇÃO EM MYRTACEAE

Na literatura referente a espécies de mirtáceas, destacam-se a micropropagação de espécies frutíferas e nativas da flora brasileira assim como a de espécies exóticas com importância comercial para a produção de madeira, frutos, óleos essenciais, para o paisagismo e como medicinais (Tabela 1).

TABELA 1 - PROTOCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO POR MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES EM ESPÉCIES DE MYRTACEAE

Espécie	Nome Popular	Meio de Multiplicação	Meio de Enraizamento	Referência
<i>Acca sellowiana</i>	Feijoa	WPM + KIN WPM + 2 iP	WPM + AIB MS + AIB	OLTRAMARI <i>et al.</i> , 2000 ROSS E GRASSO, 2010
<i>Campomanesia adamantium</i>	Gabirola	WPM + BAP	-	ROSSATO <i>et al.</i> , 2015
<i>Eucalyptus</i> spp	Eucalipto	MS, ½MS*, WPM + BAP	AIB	DUTRA <i>et al.</i> , 2009
<i>Eugenia involucra</i>	Pitanga	½ MS ou WPM + TDZ	½ MS + ANA	GOLLE <i>et al.</i> , 2012
<i>Eugenia myrtifolia</i>	Brush cherry	MS + BAP + ANA	MS	BLANDO <i>et al.</i> , 2013.
<i>Eugenia pyriformis</i>	Uvaia	WPM + BAP	WPM + AIB	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	½ MS + BAP	<i>ex vitro</i> + AIB	SILVA <i>et al.</i> , 2014
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Árvore do chá	MS + BAP	MS + ANA + BAP	JALA e CHANCHULA, 2014
<i>Myrtus communis</i>	Murta	MS+ BAP	WPM + IBA	PARRA e AMO-MARCO, 1996
<i>Psidium cattleianum</i>	Araçá	MS+ BAP+ IAA	MS+ BAP+ IAA	VIEIRA <i>et al.</i> , 2017
<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	MS + BAP	½ MS + AIB	MISHRA <i>et a.</i> , 2007
<i>Syzygium alternifolium</i>	Mogi	MS + BAP + ANA	½ MS + AIB	KHAN <i>et al.</i> , 1998
<i>Syzygium cordatum</i>	Water Berry	MS + TDZ + AIB	½ MS ou ½ WPM + AIB	DEWIR <i>et al.</i> , 2011

½MS = CONCENTRAÇÃO DOS SAIS MINERAIS DO MEIO MS REDUZIDA PELA METADE.

FONTE: O AUTOR: 2018.

Embriogênese somática é a capacidade de uma célula somática sofrer um processo de desdiferenciação e diferenciar-se novamente em um embrião somático, com características semelhantes à de um embrião zigótico, com polaridade celular definida e tecidos meristemáticos. Teoricamente este evento pode ocorrer em todas as espécies de plantas quando cultivadas em condições favoráveis (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

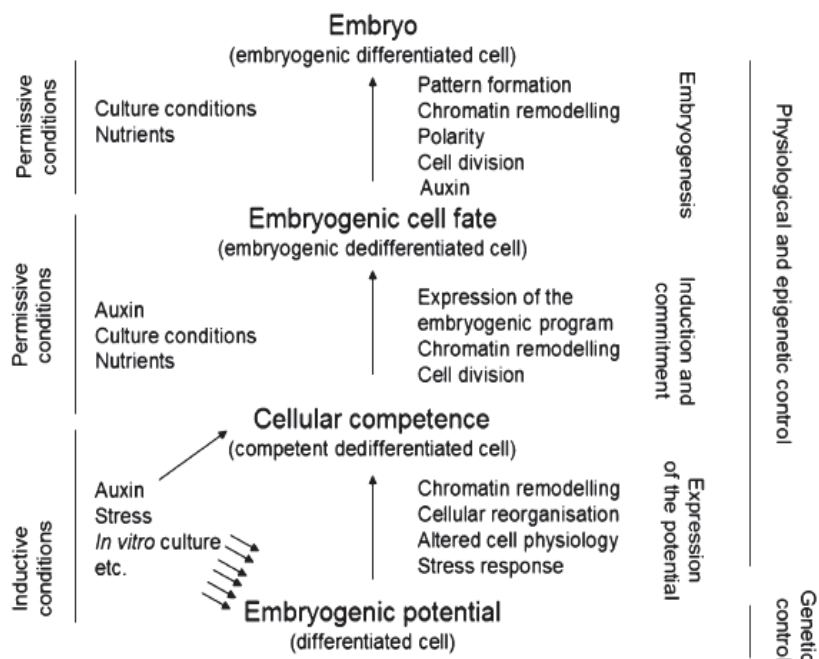
Dois processos são descritos para a formação de embriões somáticos. Pode ocorrer de forma direta, quando as células somáticas diferenciadas desdiferenciam em embriões sem a formação de agrupamentos de células indiferenciadas (calos); ou indireta, quando ocorre esta formação antes da diferenciação em embriões (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

Em termos práticos, a obtenção de embriões somáticos pela via direta é a mais desejada, pois diminui as probabilidades de alteração genética nas células, além de ser mais rápida e com baixo custo em relação a via indireta. Todavia, este processo é mais difícil de ocorrer e muitas espécies possuem apenas formação por via indireta (GEORGE *et al.*, 2008).

Para que a embriogênese somática ocorra, a célula vegetal diferenciada com potencial embriogênico precisa sofrer um estresse (geralmente causado por auxinas) que promova uma indução. Esta indução permite a expressão gênica alterando a estrutura da cromatina e, em consequência modificando a morfogênese (FEHÉR, 2005).

Após este processo, a célula torna-se competente e desdiferenciada, podendo sofrer novamente alterações na cromatina, expressão de programação embriogênica e divisão celular, formando novas células embriogênicas desdiferenciadas. Essas massas celulares podem ser multiplicadas ou seguir para a formação de embriões somáticos (célula embriogênica diferenciada) (FEHÉR, 2005). Resumidamente, a Figura 2 traz um esquema destes eventos.

FIGURA 2: MODELO HIPOTÉTICO DE EVENTOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DICOTILEDÔNEAS, RELAÇÕES GENÉTICAS E CITOLOGICAS



FONTE: FEHÉR, 2005.

In vitro, a embriogênese somática compreende cinco etapas, iniciando-se com a introdução de explantes em meios de cultura com reguladores vegetais como auxinas e citocininas. A segunda é a de proliferação ou multiplicação das culturas embriogênicas utilizando meios sólidos geralmente com os mesmos reguladores da fase anterior em concentrações reduzidas (VON ARNOLD *et al.*, 2002; GEORGE *et al.*, 2008).

Em seguida, acontece a pré-maturação dos embriões em meios de cultura com níveis mais baixos de reguladores, a maturação em meio com agentes que provocam estresse osmótico, a formação da planta (conversão) em meios contendo baixas concentrações de reguladores e por fim a aclimatização destas plantas *ex vitro* (GEORGE *et al.*, 2008).

Esta técnica apresenta diversas aplicações, entre elas, o estudo do desenvolvimento embriológico vegetal, a propagação massal, o melhoramento nos plantios homogêneos, a transformação genética, possibilidade de criopreservação dos embriões somáticos e conservação em bancos de germoplasma (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

2.3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MYRTACEAE

Protocolos de embriogênese somática em Myrtaceae foram desenvolvidos para plantas que possuem apelo comercial, como espécies frutíferas bem conhecidas (goiabeira) e silvestres que ainda não possuem ampla comercialização e manejo (jabuticabeira), porém com aumento na procura. Na Tabela 2 constam alguns destes estudos.

TABELA 2 - PROTOCOLOS DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MYRTACEAE

Espécie	Nome Popular	Explante	Meio de Indução	Meio de Conversão	Referências
<i>Acca sellowiana</i> = <i>Feijoa sellowiana</i>	Goiabeira serrana	EZM	LPm + 2,4-D	LPm + BAP + GA ₃	FRAGA <i>et al.</i> , 2013 PESCADOR <i>et al.</i> , 2008 STEFANELLO, <i>et al.</i> , 2005
		Tecido floral	MS + PIC		
		EZM	MS + 2,4-D + KIN	MS + KIN + GA ₃	CRUZ <i>et al.</i> , 1989
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Folhas	MS + PIC	-	CORREDOIRA <i>et al.</i> , 2011 MOURA <i>et al.</i> , 2017
		Cotilédone			
<i>Myrtus communis</i>	Murta	EZI	½MS + 2,4-D	½ MS	PARRA E AMO-MARCO, 1998
		EZM	MS + 2,4-D / PIC	MS + BAP + GA ₃	CANHOTO <i>et al.</i> , 1999
<i>Myrciaria aureana</i> (<i>Plinia aureana</i>)	Jabuticaba	EZM	NN* + 2,4-D	NN + PEG	MOTOIKE <i>et al.</i> , 2007
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	EZM	MS + 2,4-D	MS	RAI <i>et al.</i> , 2007

*NN: MEIO DE CULTURA DE NITSCH E NITSCH, 1969. 2,4-D: 2,4-DICLOROFLUORO BAP: 6-BENZILAMINOPURINA; EZI: EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS; EZM: EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS; GA₃: ÁCIDO GIBERÉLICO; KIN: CINETINA; PEG: POLIETILENOGLICOL; PIC: PICLORAM. FONTE: O Autor (2018).

Nestes estudos, EZ comumente foram utilizados como explantes. Este explante geralmente é utilizado por apresentar tecidos com células jovens e teoricamente pré-determinados a sofrer diferenciações e divisões celulares (JIMÉNEZ, 2005). Todavia, outros explantes podem ser utilizados, como as peças florais (CHANDRA *et al.*, 2004) ou folhas e ápices caulinares (CORREDOIRA *et al.*, 2015).

2.4 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM PLANTAS MICROPROPAGADAS

Durante a aclimatização de plantas micropropagadas, muitas mudanças anatômicas e fisiológicas podem ocorrer devido a mudanças das condições em que a planta estava *in vitro* para as condições *ex vitro*. Entre estas diferenças, estão a umidade relativa do ar, irradiância luminosa, concentração de CO₂, estresses bióticos, entre outros (POSPISILOVÁ *et al.*, 2007). Este processo é considerado muito estressante para as plantas cultivadas *in vitro* e muitas vezes podem resultar em deficiências bem como, em casos mais drásticos, na morte das plântulas (KUMAR e RAO, 2012).

Entre as mudanças fisiológicas pode-se citar a alteração dos teores de pigmentos fotossintéticos como a diminuição de clorofilas *a* e *b* e carotenoides e a estrutura anormal dos cloroplastos, o que afeta o funcionamento normal da fotossíntese (LANDO *et al.*, 2016). Com o passar dos dias na aclimatização, as plantas sobreviventes tendem a apresentar aumento gradual da concentração de pigmentos fotossintéticos em resposta às novas condições (FAISAL e ANIS, 2009).

2.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

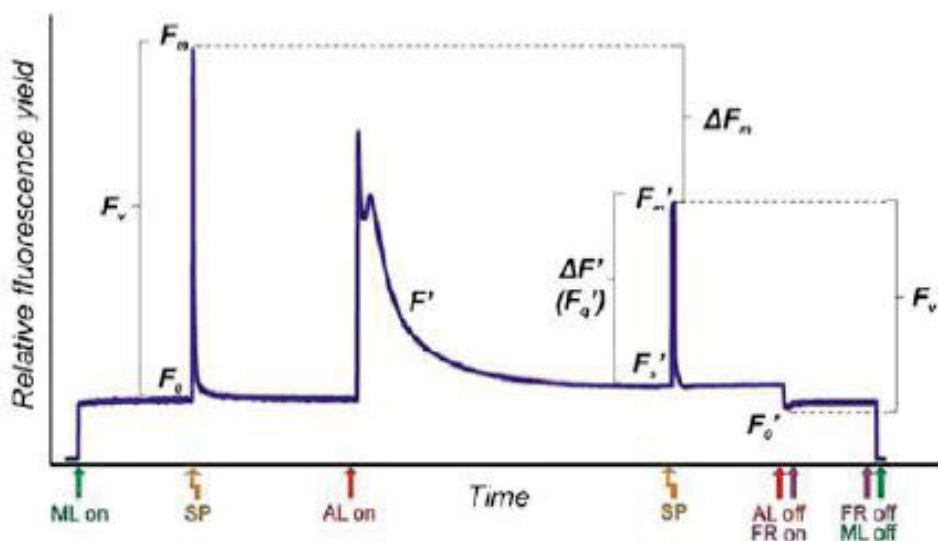
A energia luminosa é absorvida pelas moléculas de clorofila e pode seguir três caminhos: ser utilizada na fase fotoquímica da fotossíntese e seguir o processo fotossintético, ser dissipada através de calor ou ser re-emitida através da fluorescência. Assim, a energia pode ser utilizada ou perdida como nestes dois últimos casos (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

A análise da fluorescência da clorofila *a* é uma ferramenta não destrutiva, rápida e sensível, pois permite avaliar vários fatores capazes de afetar o rendimento da fluorescência, e ou sua intensidade, por meio de vários protocolos (KALAJI *et al.*, 2014). A indução da cinética rápida, também conhecida como teste OJIP, é realizada após adaptação das folhas ao escuro

permite avaliar a vitalidade das plantas e fornece informações sobre a estrutura do aparato fotossintético (STRASSER et al., 2004).

A indução da cinética lenta, também é obtida após adaptação ao escuro, porém seguida por sucessivos pulsos de luz saturante e permite obter o alcance da fluorescência máxima após este pulso (BAKER e ROSENQVIST, 2004). Os diversos parâmetros obtidos a partir da cinética lenta são representados na Figura 3.

FIGURA 3 - GRÁFICO REPRESENTANDO A CINÉTICA LENTA DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A UTILIZANDO O MÉTODO DE PULSOS DE SATURAÇÃO COM ANÁLISE DE DISSIPAÇÃO DE ENERGIA



ML: LUZ DE MEDIÇÃO; SP: PULSO DE SATURAÇÃO; AL: LUZ ACTÍNICA; FR: LUZ VERMELHO DISTANTE. FONTE: BRESTIC *et al.*, 2012.

Conforme a quantidade de fluorescência emitida, pode-se utilizar esta característica como um diagnóstico para avaliar o estado fisiológico das plantas. Esta análise permite observar como os fotossistemas estão atuando e o potencial fotossintético na planta sob determinadas condições (IBARAKI, 2008).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA de SP. Cerrado: aproveitamento alimentar. **Planaltina: Embrapa-CPAC**. v.1, p. 188, 1998.

ALVES E.O.; MOTA J.H.; SOARES TS.; VIEIRA M.C.; SILVA C.B. Ethnobotanical survey and medicinal plants characterization in forest fragments in Dourados – MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 651-658, 1998.

BAKER, R. N. ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, n. 403, v. 55, p. 1607 – 1621, 2014.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L.M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 385-389, 2004.

BLANDO, F; ONLU, S; COLELLA, G; KONCZAK, I. Plant regeneration from immature seeds of *Eugenia myrtifolia* Sims. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, n. 49, p. 388-395, 2013.

BRESTIC, M; ZIVCAK, M; KALAJI, H. M; CARPENTIER, R; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photosystem II thermostability *in situ*: environmentally induced acclimation and genotype-specific reactions in *Triticum aestivum* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 57, p. 93-105, 2012.

CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration of Myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.

CHANDRA, R.; BAJPAI, A.; GUPTA, S.; TIWARI, R. K. Embryogenesis and plant regeneration from mesocarp of *Psidium guajava* L. (guava). **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 246-248, 2004.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; IBARRA, M.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, v. 35, n. 6, p. 678-690, 2015.

CRUZ, S. G.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v. 66, p. 263-270, 1989.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. **Micropropagation: Technology and Applications**. Springer, Países Baixos. 1ª ed. P. 1-13, 1991.

DEWIR Y. H.; SINGH, N.; MNGOMEZULU, S.; OMAR, A. M. K. Micropropagation and detection of important triterpenes in *in vitro* and field grown plants of *Syzygium cordatum*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 14, p. 3078-3083, 2011.

DUTRA, F. L.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. A. Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

FAISAL, M.; ANIS, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 125-132, 2009.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: **Somatic embryogenesis**. Springer Berlin Heidelberg. p. 85-115. 2005.

FERREIRA, I. C.; GUIMARÃES, A. G.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; FILHO, J. D. S.; GUIMARÃES, D. A. S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 100-108, 2013.

FLORES, R.; BRONDANI, D. J.; CEZAROTTO, V. J.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Micropropagation and β -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 210-217, 2010.

FRAGA, H. P. F.; AGAPITO-TENFEN, S. T.; CAPRESTANO, C. A.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Comparative proteomic analysis of off-type and normal phenotype somatic plantlets derived from somatic embryos of Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). **Plant Science**, v. 210, p. 224-231. 2013.

FREIRE, G.C; GARDIN, J.P.P; BARATTO, S.C; VIEIRA, R.L; WERNER, S.S. Micropropagation's complete protocol of red araçá (*Psidium cattleianum*, Myrtaceae) from germinated seeds *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n.2, p. 234-251, 2018.

GEORGE, E. F.; HALL, M A.; GEERT-JAN, K.; **Plant propagation by tissue culture**. 3ªed., v.1, The Background. 2008.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**. Santa Maria. n. 39, p. 1606-1613, 2009.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LÉON, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucra* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**. Santa Maria. n. 22, p. 207-214, 2012.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. World Checklist of Myrtaceae, **Royal Botanic Gardens**, 2008.

IBARAKI, Y. Evaluation of photosynthetic capacity in micropropagated plants by image analysis. In: **Plant Tissue Culture Engineering**, GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Ed.) vol. 6, Springer, Países Baixos, p. 15-29, 2008.

JALA, A; CHANCHULA, N. Effect of BA and NAA on micropropagation of tea tree (*Melaleuca alternifolia* Cheel) In vitro. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 47, n.1, p. 37-43, 2014.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis (review). **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.

KALAJI, H, M; SCHANSKER, G; LADLE, J. R; GOLTSEV, V; BOSA, K; ALLAKHVERDIEV, S. I; BUSSOTTI, M. B. F; CALATAYUD, A; BROWSKI, P. D; ELSHEERY, N. I; FERRONI, F; GUIDI, L; HOGEWONING, S. W; JAJOO, A; MISRA, A. N; NEBAUER, S. G; PANCALDI, S; PENELLA, C; POLI, D; POLLASTRINI, M; ROMANOWSKA-DUDA, Z, B; RUTKOWSKA, B; SERÔDIO, J; SURESH, K; SZULC, W; TAMBUSSI, E; YANNICCARI, M; ZIVCAK, M. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis research**, n. 122, v. 2, p.121-158, 2014.

KHAN, V. S.; HAUSMAN, J. F.; RAO, K. R. Clonal multiplication of *Syzygium alternifolium* (Wight) Walp, through mature nodal segments. **Silvae Genética**, v.48, n.1, p.45-50, 1999.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; OLIVEIRA, M. F.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. T.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J; VIECELI, P. R. N. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, p. 299-305, 2010.

KUMAR, K.; RAO, I.U. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in *ex vitro* conditions – A review. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants**. v. 2, p.271-283, 2012.

LANDO, A. P.; WOLFART, M. R.; FERMINO, P. C. P.; SANTOS, M. Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 219-225, 2016.

LIMA, D. F; GOLDENBERG, R; SOBRAL, M. O gênero *Campomanesia* no (Myrtaceae) no Paraná. **Rodriguésia**. n. 62, v. 3, p. 683-693. 2011.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society** v. 30, p. 421-427, 1980.

MALDONADO-MAGANÃ, A.; BERNABÉ-ANTONIO, A.; SALCEDO-PÉREZ, E.; CRUZ-SOSA, F. *In vitro* regeneration of *Calophyllum brasiliense* Cambess: A valuable medicinal tree. **African Journal of Biotechnology**, vol. 14, p. 2831-2835, 2015.

MAXWELL, K.; JOHNSON, N. G. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Camponesia adamantium* Camb.- Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MISHRA, M.; CHANDRA, R.; PATI, R.; BAJPAI, A. 2007. Micropropagation of guava (*Psidium guava* L.). **Acta Horticulturae**, v. 735, p. 155-158, 2007.

MOREIRA, S. T. M.; SALVAGNINI, L. E.; SANTOS, E.; SILVA, V. Y. A.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO R. C. L. R. Antidiarrheal activity of *Campomanesia xanthocarpa* fruit. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, n. 5, p. 528-531, 2011.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M.C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, L. C; XAVIER, A; CRUZ, A. C. F; GALLO, R; GATTI, K. C; MIRANDA, N. A; OTONI, W. C. Effects of explants type, culture media and Picloram and DICAMBA growth regulators on induction and proliferation os somatic embryogenesis in *Eucalytus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, n. 41, v. 5, p. 1-10, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, C. L.; VARGAS, P. D.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess.) efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde**, v.3, n. 2, p. 20-26, 2008.

NITSCH, J. P; NITSCH, C. Haploids plants from pollen grains. **Science**, n. 163, p. 85-87, 1969.

OLIVEIRA, S. L.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439 – 453, 2013.

OLTRAMARI, A. C; DAL VESCO, L. L; PEDROTTI, E. L; DUCROQUET, J. H. H; NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000

QUOIRIN, M; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.437-442, 1977.

PARRA L e AMO-MARCO J. B. Effect of plant growth regulators and basal media on *in vitro* shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. **Biologia Plantarum**. v. 38, n. 2, p. 161-168, 1996.

PARRA L e AMO-MARCO J.B. Secondary Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Myrtle (*Myrtus communis* L.), **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 325-330. 1998.

PAVAN, F. R; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PELEGRINI, L. L.; RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H. S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**. n. 10, p. 1527-1533, 2011.

PESCADOR, R.; KERBAUY, B. G.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

POSPISILOVÁ, J.; TICHÁ, I. KADLECEK, P.; HASEL, D. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**. v. 42, p. 481-497, 1999.

POSPISILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HASEL, D.; SEMORÁDOVÁ, S. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂, concentration and abscisic acid (a review). **Acta Horticulturae**. v. 784 p. 29-38, 2007.

PROENÇA, C. *et al.* In MARTINELLI G. e MORAES M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1º ed. Rio de Janeiro. Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Centro Nacional de Conservação da Flora, Parte II: Myrtaceae, p. 714-743, 2013.

RAI, K. M.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.

RAVEN, P.H; EVERT, R. F; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7ª. ed. Coord. Trad. J.E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. G. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peróba-Rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**. v. 9, n. 4, p. 517-524, 2005.

ROCHA, da S. C.; QUORIN, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabrelea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa – MG n. 31, p. 43-50, 2007.

ROSSATO, M; SCHUMACHER P. V; NETTO, A. P. C; SOUZA, G. C; REIS, E. F; STEIN, C. V. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* CAMB. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, n. 2, v. 11, p 70-77, 2015.

ROSS, S.; GRASSO, R. *In vitro* propagation of 'Guayabo del país' (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret). **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**. v. 4, n. 1, p. 83-87, 2010.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE de, L. A.; SOUZA de, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**. vol. 7 n. 2, p. 117-123, 2001.

SCUTTI, M.B; ZANETTE, F. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**. V.1, n 12, p. 75-82, 2000.

STEFANELLO, S; DAL VESCO, L. L; DUCROQUET, J. P. H. J; NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissue of *Feijoa sellowiana* Berg. **Scientia Horticulturae**, N. 115, P. 117-120, 2005.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. *In*: PAPAGEORGIOU, G.; GOVINDJEE (eds) **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**, advances in photosynthesis and respiration. Springer, Dordrecht, pp 321–362. 2004.

SILVA, P. R. D. da.; RISPOLI, R. G.; MINOZZO, M. M.; JOBIM, L. H.; JUNGES, M.; STEFENON, V. M. A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and micropropagation. **Annals of Forest Research**. v. 57, n. 1, p. 39-45, 2014.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 29 Jun. 2016

SOUZA V. C. e LORENZI H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III**. 1ª edição, Nova Odessa, Instituto Plantarum, 650 páginas, 2012.

UNEMOTO, L. K.; FARIA de, R. T.; MENEGUCE, B.; ASSIS, A. M. de. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore- (Gesneriaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy**. , vol. 28, p. 503-506, 2006.

VIECELI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECELI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**. n. 234, p. 85-92, 2014.

VINAGRE, A. S.; RONNAU, A. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U.; WIILLAND, E. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 5, p. 870-874, 1980.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Review: Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

CAPÍTULO 1

MICROPROPAGAÇÃO DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg – MYRTACEAE) A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS

CURITIBA

2018

RESUMO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), conhecida como guabirobeira, é uma espécie arbórea nativa do Cerrado e da Mata Atlântica que possui potencial econômico como frutífera e medicinal. Suas sementes são recalcitrantes e isto dificulta a sua propagação por métodos tradicionais. A micropropagação pode ser utilizada para promover a sua propagação vegetativa. O objetivo desse estudo foi desenvolver um protocolo de micropropagação da guabirobeira a partir de segmentos nodais. Para iniciar o processo, foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo duas gemas axilares, obtidos de plantas juvenis cultivadas *in vitro*. Para o estabelecimento das culturas, foram testados os meios de cultura LPM, MS, QL e WPM, suplementados com duas concentrações (2,2 e 4,4 μM) de benzilaminopurina (BAP). O meio que permitiu o estabelecimento das culturas e provocou maior formação de brotos foi o WPM adicionado de BAP. A seguir, foram testadas as citocininas 2-iP, BAP, cinetina e zeatina (2,2 e 4,4 μM) durante três subcultivos. Todas as citocininas testadas promoveram a formação de brotos novos sendo a maior taxa de proliferação (até 3,02 no terceiro subcultivo) obtida no meio de cultura contendo 2,2 μM de BAP. No enraizamento, foram testados os meios MS, QL e WPM sem reguladores vegetais e o WPM mostrou-se mais efetivo com 48% de formação de raízes adventícias. Posteriormente, foram testadas as auxinas ácido-indolbutírico (AIB 4,9, 9,8, 14,7, 24,6 e 34,4 μM) e ácido naftaleno-acético (ANA 5,4; 10,7; 16,1; 26,8; 37,6 μM). O AIB promoveu maior taxa de enraizamento (70%) após 60 dias de cultivo com pouca formação de calo na base dos explantes, sendo a concentração de 4,9 μM a mais recomendada. Dois sistemas foram testados para a aclimatização das mudas em casa de vegetação: cobertura com filme de PVC e caixa plástica com tampa, com perfurações do filme de PVC ou abertura gradual da caixa. Dois substratos foram comparados: Plantmax® e mistura Plantmax®/Vermiculita Dimy® (1:1 v/v). Houve maior taxa de sobrevivência (52%) quando as plantas foram mantidas dentro da caixa plástica após 60 dias na mistura de substratos. Foi possível desenvolver um protocolo completo de micropropagação de guabirobeira a partir de segmentos nodais. Novos estudos são necessários para melhorar o protocolo e aumentar o número de plantas micropropagadas obtidas.

Palavras-chave: Citocininas, cultura de tecidos vegetais, gemas axliares, planta frutífera.

ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), popularly known as guabiroba, is a tree species native to Savanna and Atlantic Forest (Brazil) with economic potential as fruit tree and medicinal plant. Its seeds are recalcitrant and this renders difficult its propagation by traditional methods. The micropropagation technique can be used to promote vegetative propagation of this species. The aim of this study was to develop a micropropagation protocol of guabirobeira from nodal segments. To begin the process, nodal segments approximately 1 cm long were used, containing two axillary buds obtained from juvenile plants grown *in vitro*. For the establishment of cultures, LPM, MS, QL and WPM culture media were tested, supplemented with different concentrations of benzylaminopurine (BAP). The medium that allowed the establishment of the cultures and caused a greater proliferation of buds was the WPM supplemented with 2,2 μ M BAP. Moreover, different concentrations of 2-IP, BAP, KIN and ZEA were tested during several subcultures. All these cytokinins promoted the formation of new shoots and the highest proliferation rate (up to 3.02 in the third subculture) was obtained again with BAP at 2.2 μ M. For rooting, the MS, QL and WPM media were first tested without plant regulators. WPM was more effective with 48% adventitious root formation. Subsequently, different concentrations of IBA and NAA were tested. IBA promoted a higher rooting rate (70%) than NAA after 60 days, with low callus formation at the explant base. However, this species showed root formation without auxin application with similar rates to that of exogenous auxin treatment. Two systems were tested for the acclimatization of seedlings in a greenhouse: PVC film cover and plastic box with lid, with perforations of the PVC film or gradual opening of the box. Two substrates were compared: Plantmax[®] commercial substrate and a mixture of Plantmax with Vermiculite (1:1 v/v). There was a higher survival rate (50%) for plantlets maintained for 45 days in a plastic box without significant difference between the two substrates tested. It was possible to develop a complete micropropagation protocol of guabirobeira from nodal segments. Further studies are needed to improve the protocol and increase the number of micropropagated plants obtained.

Key-words: axillary buds, cytokinins, fruit tree, plant tissue culture.

1. INTRODUÇÃO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg é uma espécie nativa do Brasil pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como guabiroba, que possui ocorrência nos Biomas Cerrado e Mata Atlântica (SOBRAL *et al.*, 2016). A espécie apresenta princípios medicinais amplamente utilizados na cultura popular no tratamento de tuberculose (PAVAN *et al.*, 2009), como anti-inflamatória, anti-oxidante e com um crescente interesse em pesquisas para o combate do diabetes (VINAGRE *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; VIECELI *et al.*, 2014).

De uma forma extrativista, a guabirobeira é utilizada por moradores locais como fonte de madeira para lenha e para consumo dos frutos *in natura* além de produção de geleias, sucos, doces e licores a partir dos seus frutos que possuem um sabor adocicado (ALMEIDA, 1998). Possui sementes recalcitrantes, fato este que dificulta a germinação, inviabiliza o armazenamento e o plantio. Esta característica se torna uma barreira a sua propagação (MELCHIOR *et al.*, 2006).

A micropropagação é definida como um conjunto de técnicas que visam a propagação vegetativa de plantas em larga escala a partir do cultivo de tecidos ou órgãos vegetais sob condições controladas *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008). Tais técnicas possuem diversas aplicações e vantagens, como a propagação de espécies lenhosas com interesses comerciais e/ou que apresentam dificuldades de reprodução em condições naturais, propagação em larga escala, transformação genética, estudo do desenvolvimento vegetal, entre outras (GOLLE *et al.*, 2009).

Estudos de micropropagação em indivíduos pertencentes às Myrtaceae ainda são escassos, mas mostram que é possível a obtenção de plantas regeneradas e aclimatizadas, como no caso das espécies *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO *et al.*, 2008), *Acca sellowiana* (ROSS e GRASSO, 2011) e *Eugenia uniflora* (SILVA *et al.*, 2014).

Ainda não existe nenhum protocolo de micropropagação completo estabelecido para *C. xanthocarpa* até o momento e, devido às suas dificuldades de propagação, a obtenção de tal protocolo é necessária.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elaborar um protocolo completo de micropropagação de guabirobeira utilizando a técnica de multiplicação de gemas axilares.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer culturas assépticas de segmentos nodais *in vitro*;
- Testar diferentes meios de cultura e concentrações de 6-benzilaminopurina para o estabelecimento das culturas;
- Comparar diferentes citocininas e concentrações na etapa de indução de brotações múltiplas;
- Estudar o efeito de auxinas no enraizamento de microestacas;
- Estabelecer as melhores condições para aclimatização das plantas micropropagadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE ESTUDO

Frutos maduros foram coletados de uma única árvore matriz em dezembro de 2015 em São José dos Pinhais, Curitiba – Paraná e transportados até o Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Todos os experimentos foram realizados nesse Laboratório. Uma amostra da planta matriz foi coletada, herborizada, identificada taxonomicamente por uma especialista em Myrtaceae e tombada no herbário da UFPR sob o número de identificação: UPCB: 91642.

Os frutos foram despulpados manualmente e as sementes foram desinfestadas de acordo com o protocolo estabelecido por Silva (2015), com imersão em etanol (70%) durante um minuto, seguido por imersão em hipoclorito de sódio (5%) adicionado de duas gotas de Tween-20 durante dez minutos e três lavagens com água destilada esterilizada. Posteriormente as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura basal WPM. A partir das plantas germinadas e cultivadas *in vitro*, segmentos nodais de *Campomanesia xanthocarpa* contendo duas gemas axilares foram utilizados como explantes iniciais.

3.2 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Todos os meios foram adicionados de sacarose (3%) e o pH foi ajustado em 5,8 com soluções de HCl e NaCl 0,1 N antes da adição de ágar (0,6%) e da autoclavagem. Os meios foram vertidos em frascos de vidro com 8,5 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro, cada um contendo 40 mL de meio, tampados com tampa plástica. Posteriormente foram autoclavados durante 20 minutos a 120 °C. As culturas foram mantidas sala de crescimento sob luz fluorescente de tipo

branca fria com densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de 50 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26 ± 2 °C.

3.3 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, os explantes foram cultivados em meio WPM adicionado de PPM (0,1%) e BAP (2,2 e 4,4 μM), bem como em meio controle sem PPM.

Após 30 dias, os novos brotos foram separados do explante inicial e subcultivados nos mesmos tratamentos com meios frescos. Em 30 e 60 dias, foram avaliadas as percentagens de contaminação das culturas, número médio de brotos (NMB) e segmentos formando brotos (SFB).

Em um segundo experimento foi utilizado meio WPM suplementado com BAP (2,2 μM) com e sem adição do PPM. Após 30 dias foram avaliados a percentagem de contaminação das culturas, NMB e SFB.

3.4 MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES

3.4.1 MEIOS DE CULTURA E BAP

Foram realizados três experimentos com diferentes meios de cultura (LPm, MS, QL e WPM). As vitaminas utilizadas foram as mesmas propostas para cada um, exceto nos meios LPm e QL, onde foram utilizadas as vitaminas do meio MS. Os meios foram suplementados ou não com BAP.

Os explantes foram obtidos a partir das plantas germinadas e cultivadas *in vitro*, exceto no caso do meio LPm, onde os explantes foram obtidos a partir da multiplicação em meio WPM suplementado com BAP (2,2 μM).

No primeiro experimento, foram utilizados os meios MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), suplementados com BAP

(2,2 e 4,4 μM) e um controle sem BAP. Após 30 dias, os explantes foram subcultivados em meios frescos sob a mesma condição inicial.

No segundo experimento, foram testados os meios citados acima assim como o meio QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977), suplementados com BAP (2,2 μM). Por fim, foram testados os meios MS, WPM e LPm (VON ARNOLD e ERIKSSON, 1980), suplementados com BAP (2,2 μM). Após 30 dias, os explantes foram divididos novamente em um segmento com duas gemas axilares e repicados para meios frescos.

3.4.2 CITOCININAS

Cinco segmentos nodais com aproximadamente um centímetro de comprimento, contendo duas gemas axilares e obtidos de plantas com quatro meses de idade, germinadas e cultivadas *in vitro*, foram inoculados em cada frasco contendo 40 mL de meio WPM contendo PPM (0,1%).

Foram realizados vários experimentos com diferentes citocininas. Primeiramente, foram testadas 2-iP, BAP, KIN e ZEA (2,2 e 4,4 μM) e um meio controle sem citocinina. A cada 30 dias, os novos brotos formados foram transferidos para frascos contendo meios frescos nas mesmas concentrações de citocininas durante 3 subcultivos.

Posteriormente, foram realizados experimentos apenas com 2-iP (0, 2,2, 4,4, 6,6 e 8,8 μM) ou BAP (0, 2,2, 4,4 e 6,6 μM).

3.4.2 AVALIAÇÕES E SUBCULTIVOS

A cada 30 dias foram avaliados o número médio de segmentos formando brotos, que foi expresso em percentagem (SFB), o número de brotos novos formados e calculada a média por segmento nodal ou por broto (NMB), a oxidação dos brotos e necrose total.

Os brotos novos foram seccionados, separados do segmento nodal (explante inicial), subdivididos de forma a obter novos segmentos contendo duas gemas axilares, e subcultivados em meios frescos a cada mês. Quando necessário (para testar a resposta em outras formulações), os brotos foram subcultivados em meios diferentes do inicial.

Foi realizado um subcultivo para os experimentos de meios de cultura e multiplicação com 2-IP. Para o experimento de multiplicação com BAP e diferentes citocininas, foram realizados três subcultivos.

3.5 ENRAIZAMENTO

Foram realizados três experimentos. Primeiramente foram testados os meios de cultura, onde as microestacas com aproximadamente um cm de altura, obtidas da etapa de multiplicação (em meio WPM com ou sem BAP), foram transferidas aleatoriamente para os meios MS, WPM e QL na ausência de reguladores vegetais. No segundo experimento, foram testadas as concentrações de 4,9, 9,8, 14,7, 24,6 e 34,4 μM de ácido-indol-butírico (AIB) e de ácido naftaleno-acético (ANA). No terceiro, foram testadas as concentrações de 1,2, 2,4 e 4,9 μM de AIB e um controle sem AIB. A partir do segundo experimento, todos foram realizados com meios WPM e PPM (0,1%).

As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 3.2, exceto na primeira semana de cultivo, onde elas ficaram no escuro.

Após 30 e 60 dias, foi avaliada a percentagem de microestacas enraizadas, o número médio de raízes por microestaca e, quando necessário, necrose dos explantes.

3.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS

As microestacas enraizadas sem formação de calo na base, obtidas dos tratamentos com e sem AIB foram utilizadas nos experimentos de aclimatização. As microestacas sem raízes e as do tratamento com ANA foram descartadas devido à presença de calos.

As plantas enraizadas foram retiradas do meio de cultivo, lavadas em água corrente e transplantadas em bandejas de plástico divididas em células de 3,5x3,5 cm² contendo substrato florestal Plantmax[®] ou em uma mistura deste substrato com vermiculita Dimy[®] em uma proporção de 1:1 (v/v).

As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob luz de lâmpadas de vapor de mercúrio com PPFD de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, temperatura máxima de 22 °C dia e mínima de 18°C noite e irrigação através do sistema automático com nebulização por três minutos a cada seis horas.

A aclimatização das mudas foi feita de duas formas. Primeiramente, as bandejas com as plantas foram cobertas por um filme de plástico PVC transparente com perfurações e regas feitas manualmente, todos os dias. Após este período, o plástico foi removido completamente, mantendo irrigação automática.

Em outro experimento, as bandejas com as plantas, foram colocadas dentro de uma caixa plástica de polipropileno, transparente, de 46x30x16cm (LCA), fechada com a própria tampa (mesmo material) e mantida em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h e temperatura de 24 \pm 2°C. As regas foram feitas manualmente (duas regas semanais). Após sete dias, a caixa foi transferida para casa de vegetação com abertura gradual logo em seguida

(experimento 2) e após 15 dias (experimento 3) com remoção completa após 30 dias.

Durante 7, 15, 30, 45 e 60 dias foram avaliadas as percentagens de sobrevivência.

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos foram utilizados cinco explantas por frasco e um total de 12 frascos por tratamento. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC).

Para explorar os resultados das variáveis respostas (SFB, NMB oxidação e enraizamento) e das variáveis preditoras (meios de cultura, tipo e concentrações dos reguladores vegetais), os dados foram ajustados a diferentes modelos de acordo com a distribuição (binomial ou linear) das variáveis respostas. As diferenças das variáveis foram analisadas por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição *Poisson* e a função de ligação *logit*, a qual associa os valores esperados da resposta aos preditores lineares no modelo. As variáveis categóricas (presença/ausência) foram analisadas com distribuição binomial (OKSANEM *et al.* 2013).

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando a software R 3.2.5 e os pacotes *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2013), *car* (FOX e WEISBERG, 2011), *lme4* (BATES *et al.*, 2015) e *nlme* (PINHEIRO *et al.*, 2016). Os testes *post-hoc* (teste de Tukey com probabilidade de erro menor que 0,001) após correções de Bonferroni foram realizados utilizando o pacote *glht* no R (HOTHORN *et al.*, 2016).

4. RESULTADOS

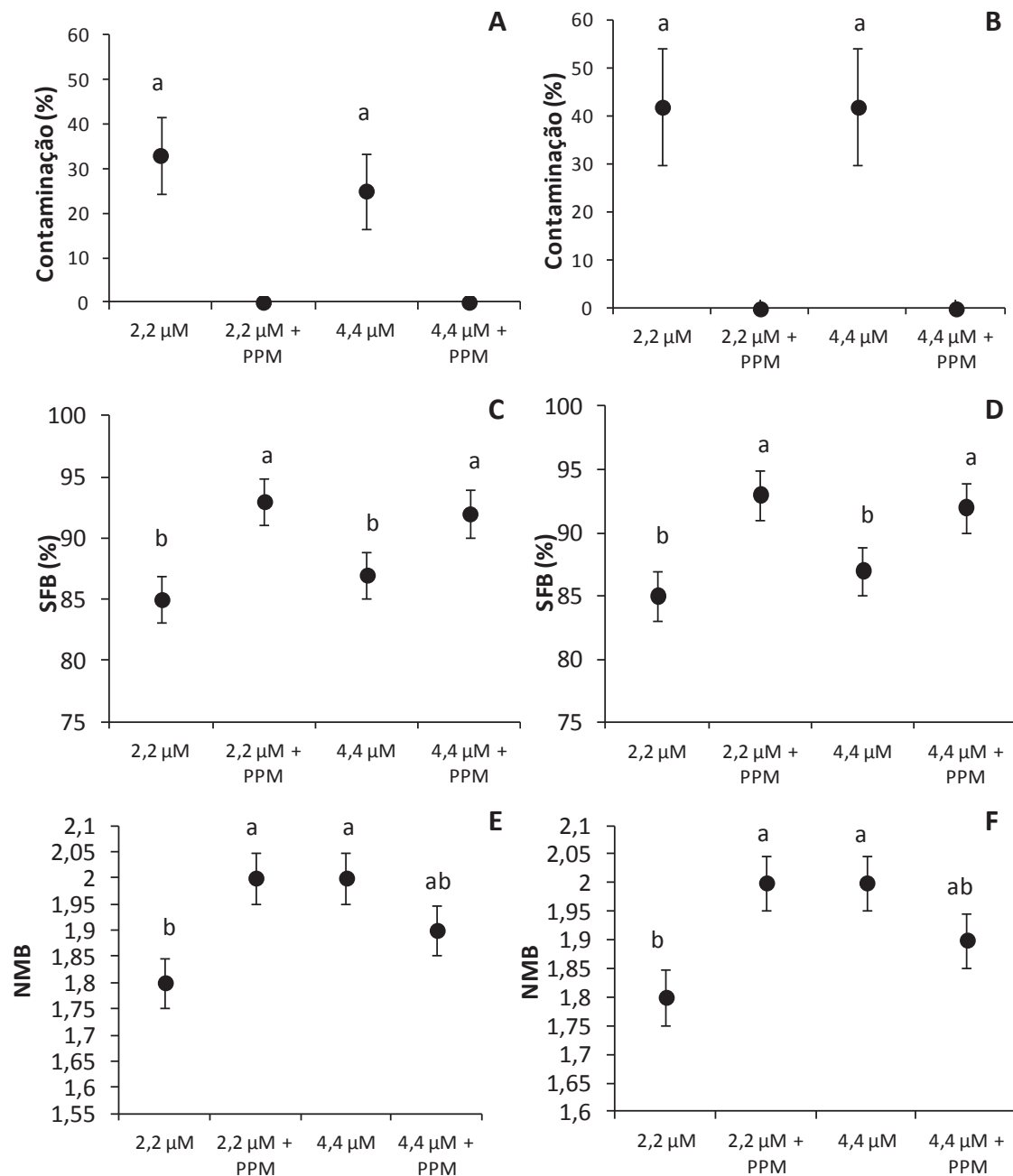
4.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

No primeiro experimento, as taxas de contaminação diferiram entre os tratamentos com e sem PPM (FIGURA 1). Nos meios contendo o biocida, não foram observadas quaisquer contaminações durante todo o período analisado. Diferentemente, nos meios sem PPM, houve um máximo de 33% de contaminação em 30 dias e 42% em 60 dias (X^2 984,74; G.L. 3; $p \leq 0,001$ e X^2 1386,3; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 1A-B). Não houve interação entre os fatores (BAP e presença/ausência de PPM; $p \geq 0,001$) para a contaminação das culturas.

Após 30 dias, o SFB (X^2 12,847; G.L. 3; $p \leq 0,001$) foi maior nos tratamentos contendo PPM, com média de 93%, em comparação com os tratamentos sem PPM (87%). O NMB foi dois nos tratamentos com PPM e adição de 4,4 μ M de BAP diferindo (X^2 2,0673; G.L. 3; $p \leq 0,001$) apenas do tratamento sem PPM acrescido de 2,2 μ M de BAP (FIGURA 1 C,E).

Após 60 dias de cultivo, os tratamentos tiveram elevada percentagem de SFB: nos meios contendo PPM e no meio sem PPM com 4,4 μ M de BAP, os valores tiveram média de 97% diferindo (X^2 14,833; G.L. 3; $p \leq 0,001$) do tratamento sem PPM com 2,2 μ M de BAP (FIGURA 1D). O maior NMB (X^2 0,34669; G.L. 3; $p \leq 0,001$) foi de 2,7 na presença de 4,4 μ M de BAP e de 2,2 μ M de BAP com PPM (FIGURA 1F). Ambos os cultivos apresentaram interação entre os fatores (BAP e presença/ausência de PPM; $p \leq 0,001$) para SFB e NMB.

FIGURA 1 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS E CONTAMINAÇÕES DAS CULTURAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS EM MEIO WPM, SUPLEMENTADO COM BAP COM E SEM PPM® (0,1%)

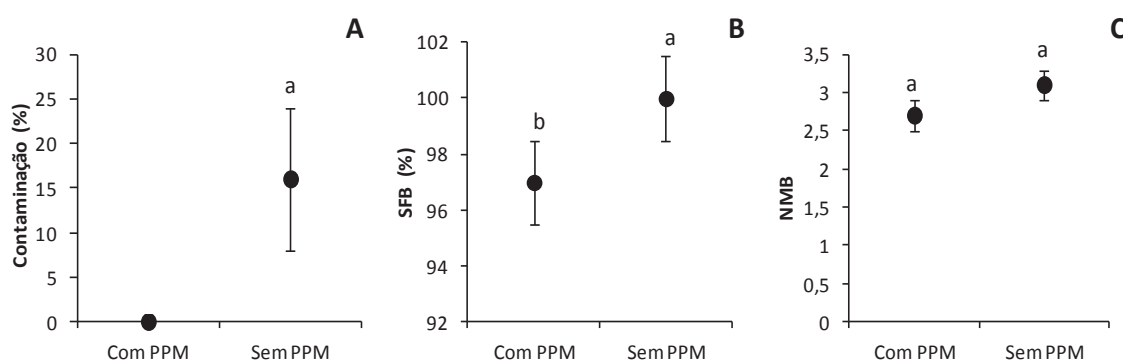


A,C,E: 30 DIAS; B,D,F: 60 DIAS. SFB: SEGMENTOS FORMANDO BROTOS (%). NMB: NÚMERO MÉDIO DE BROTOS NOVOS POR SEGMENTO COM BROTO. DADOS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

No segundo experimento, os meios de cultura sem PPM apresentaram 17% de contaminação por fungos (X^2 277,26; G.L. 1; $p \leq 0,001$) que não ocorreram nos meios com adição do biocida (FIGURA 2A).

O SFB foi maior (X^2 1,1844; G.L. 1; $p \leq 0,001$) no tratamento sem PPM com 100% de formação de novos brotos (FIGURA 2B). O NMB não apresentou diferença (X^2 0,678; G.L. 1 $p \geq 0,001$) entre os tratamentos e foi obtido um valor máximo de três (FIGURA 2C) Neste período, não houve perdas por oxidação e/ou necrose.

FIGURA 2 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Campomanesia xanthocarpa* EM MEIO WPM COM 2,2 μ M DE BAP EM FUNÇÃO DA PRESENÇA DE PPM (0,1%) NO MEIO, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO



A: CONTAMINAÇÃO (%); B: SFB: SEGMENTOS FORMANDO BROTOS (%); C: NMB: NÚMERO MÉDIO DE BROTOS NOVOS POR SEGMENTO COM BROTO. DADOS COM A MESMA LETRA NA COLUNA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

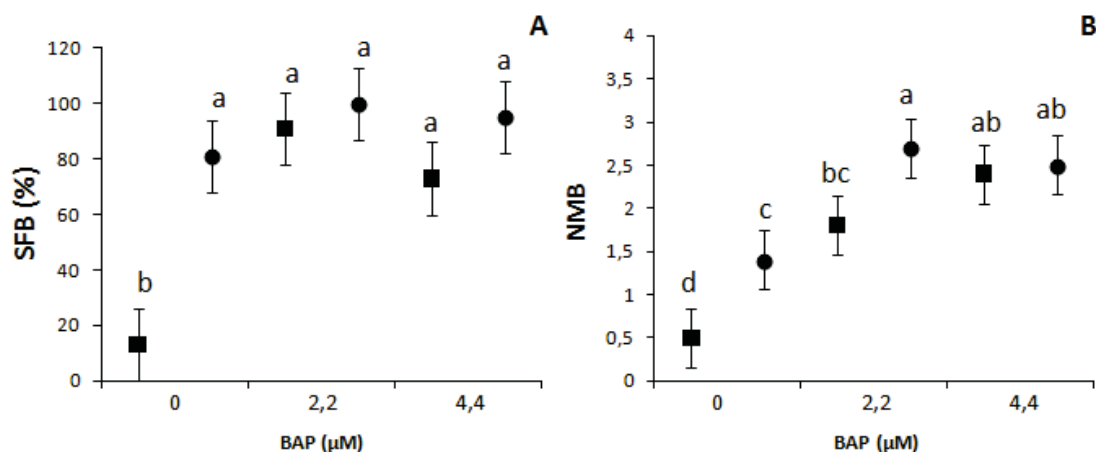
4.2 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

4.2.1 EFEITO DA FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E DO BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Após 30 dias de cultivo, os explantes cultivados em meio MS na ausência de regulador apresentaram percentagem de formação de brotos (SFB) significativa (X^2 1138; G.L. 5; $p \leq 0,001$) inferior ao dos explantes cultivados em meio WPM contendo ou não BAP. Resposta semelhante ocorreu

no meio MS contendo BAP (4,4 μ M) (FIGURA 3A). Os meios WPM com BAP e MS com 4,4 μ M de BAP apresentaram os maiores valores para NMB (2,7 e 2,4, respectivamente) diferindo (X^2 167,91; G.L. 5; $p \leq 0,001$) dos demais tratamentos (FIGURA 3B). Houve interação entre os fatores (meios de cultura e concentrações de BAP: $p \leq 0,001$) tanto para SFB quanto para o NMB.

FIGURA 3 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Campomanesia xanthocarpa* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BAP, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO

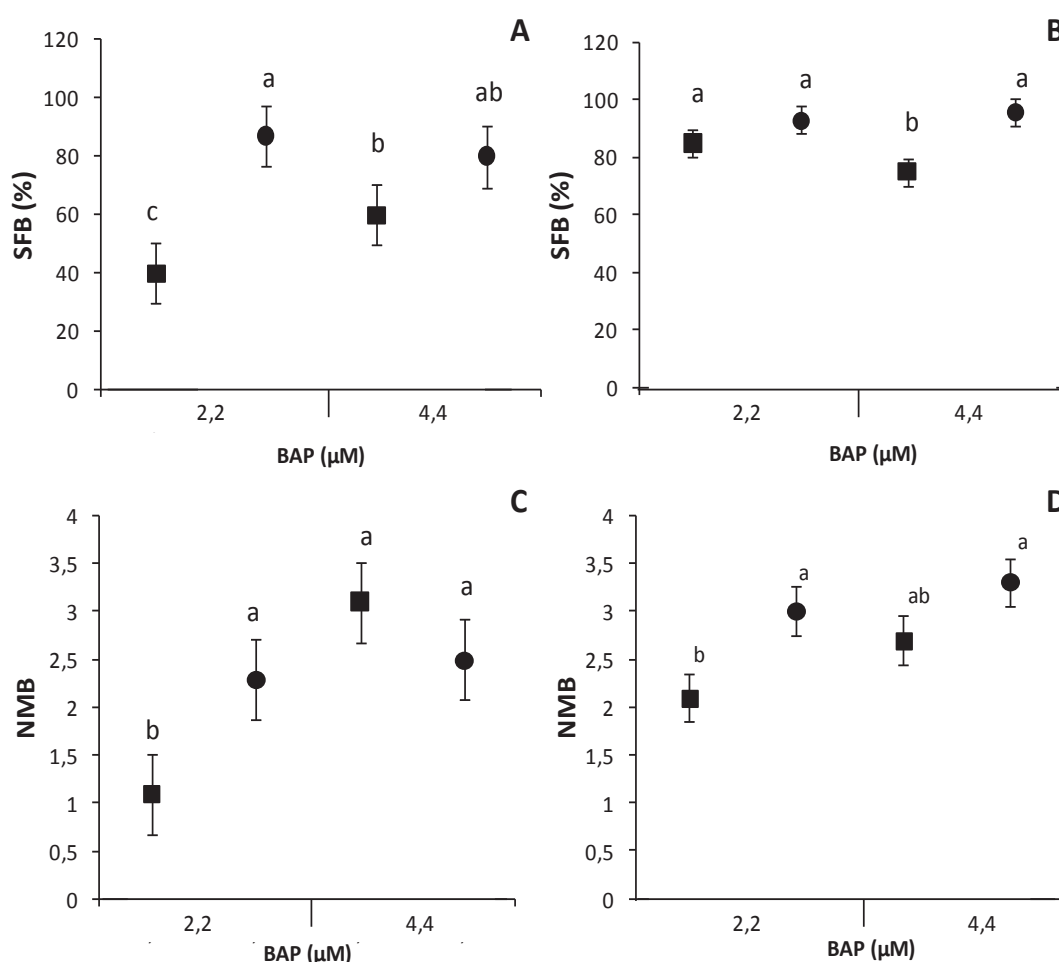


A: SEGMENTOS FORMANDO BROTOS (%); B: NÚMERO MÉDIO DE BROTOS NOVOS POR SEGMENTO COM BROTO. QUADRADOS: MEIO MS; CIRCULO: MEIO WPM. TODOS OS MEIOS DE CULTURA CONTINHAM 0,1% DE PPM. DADOS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $p \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

No experimento seguinte, no final do primeiro subcultivo (30 dias), as maiores percentagens de SFB (87 e 80%) foram obtidas no meio WPM suplementado com 2,2 e 4,4 μ M de BAP (X^2 4,462; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 4A). O NMB mais alto foi encontrado no meio MS suplementado com 4,4 μ M de BAP (3,1) e nos tratamentos com WPM (2,5 e 2,3). Já o menor valor foi 1,1 obtido no meio MS com 2,2 μ M (X^2 24,669; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 4C).

No segundo subcultivo (60 dias), valores de SFB foram os maiores (X^2 3,692; G.L. 3; $p \leq 0,001$) nos meios WPM e MS suplementados com 2,2 μM de BAP, variando entre 85 e 93% enquanto foi de 75% no meio MS com 2,2 μM de BAP (FIGURA 4B). Novamente, o NMB foi maior (X^2 24,620; G.L. 3; $p \leq 0,001$) nos tratamentos com meio WPM (3,3 e 3,0) assim como no meio MS com 4,4 μM de BAP (2,7) (FIGURA 4D). Novamente, houve interação entre os fatores (meios de cultura e concentrações de BAP: $p \leq 0,001$) para SFB e NMB durante todos os cultivos.

FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Campomanesia xanthocarpa* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BAP NO MEIO, DURANTE DOIS CULTIVOS DE 30 DIAS CADA (TOTAL: 60 DIAS)



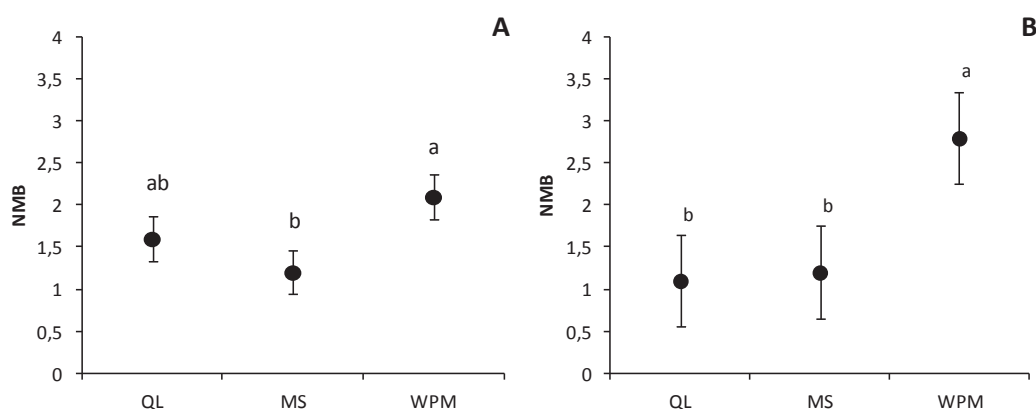
A-B: SFB: SEGMENTOS FORMANDO BROTOS (%). C-D: NMB: NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR SEGMENTO COM BROTO. QUADRADOS: MEIO MS; CÍRCULOS: MEIO WPM. TODOS OS MEIOS CONTEM PPM (0,1%). DADOS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO.

FONTE: O Autor (2018).

Todos os segmentos formaram brotos novos nos três meios, tanto no cultivo inicial quanto no subcultivo (X^2 0; G.L. 2; $p \leq 0,001$ e X^2 0,44; G.L. 2; $p \leq 0,001$). Em 30 dias de cultivo inicial, os explantes cultivados nos meios WPM e QL apresentaram maior NMB (X^2 46,061; G.L. 2; $p \leq 0,001$) com 2,1 e 1,6 respectivamente, enquanto que os cultivados em meio MS tiveram menor valor (1,2) e não diferiram do meio QL (FIGURA 5A).

Em 60 dias, o meio WPM apresentou o maior NMB (2,8) em relação aos demais meios (X^2 76,195; G.L. 2; $p \leq 0,001$). Os tratamentos com meio QL e MS não diferiram entre si e tiveram NMB igual a 2,1 (FIGURA 5B).

FIGURA 5 – NÚMERO MÉDIO DE BROTO POR SEGMENTO COM BROTO (NMB) DE *Campomanesia xanthocarpa* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA ADICIONADO DE PPM (0,1%) E 2,2 μ M DE BAP, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO E 30 DIAS DE SUBCULTIVO

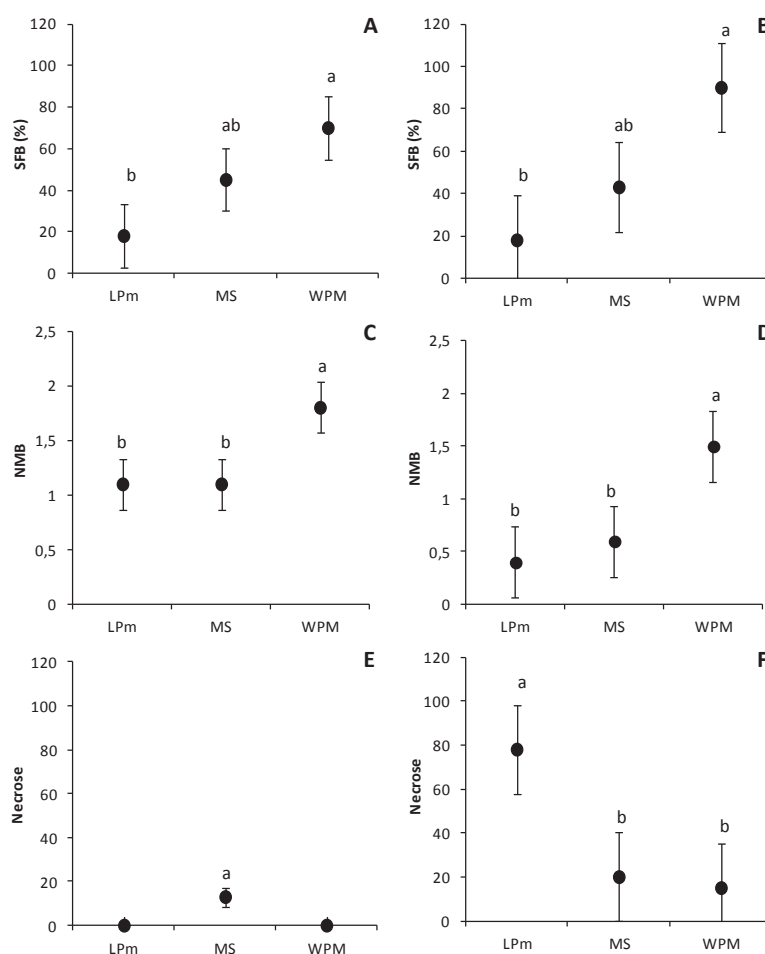


A: CULTIVO INICIAL; B: SUBCULTIVO. DADOS COM A MESMA LETRA ACIMA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

Quando foram comparados os meios LPm, MS e WPM, em 30 dias de cultivo, a percentagem de SFB foi maior no meio WPM (70%) e diferiu (X^2 270,03; G.L. 2; $p \leq 0,001$) em relação ao meio LPm (18%) enquanto que o meio MS teve 45% e foi intermediário entre os dois (FIGURA 6A). O NMB mais elevado (X^2 32,553; G.L. 2; $p \leq 0,001$) foi obtido no meio WPM (1,8) enquanto que os demais meios tiveram valor igual a 1,1 (FIGURA 6C). Neste período, o meio MS foi o único que apresentou necrose dos explantes com um total de 13% (FIGURA 6E).

Após 60 dias, o meio WPM apresentou a maior percentagem de SFB com 90% (X^2 441,95; G.L. 2; $p \leq 0,001$) (FIGURA 6B). Este meio também teve o maior NMB (X^2 44,397; G.L. 2; $p \leq 0,001$) sendo 1,5 (FIGURA 6D). No fim do primeiro subcultivo, ocorreu necrose seguida de morte dos explantes em todos os meios, sendo a maior (X^2 4,350; G.L. 2; $p \leq 0,001$) no meio LPm com 78% e a menor no WPM com 15% (FIGURA 6F).

FIGURA 6 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Campomanesia xanthocarpa* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA, NO CULTIVO INICIAL E NO FINAL DO PRIMEIRO SUBCULTIVO



A,C,E: CULTIVO INICIAL; B,D,F: SUBCULTIVO. SFB: SEGMENTOS FORMANDO BROTOS (%); C-D: NMB: NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR SEGMENTO COM BROTO; E-F: NECROSE DOS EXPLANTES. TODOS OS MEIOS DE CULTURA CONTEM 2,2 μ M DE BAP E 0,1% DE PPM. DADOS COM A MESMA LETRA NA COLUNA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

4.2.2 EFEITO DAS CITOCININAS

Após 30 dias de cultivo inicial, todas as citocininas, com exceção de 2,2 μM de 2-iP e 4,4 μM de KIN (valores mais baixos), induziram formação de brotos novos com valores variando entre 95 e 100% sem diferença entre os tratamentos e o controle (X^2 4,605; G.L. 7; $p \leq 0,001$) (FIGURA 7). Nos tratamentos com citocininas, o NMB foi maior que no meio controle (X^2 2,417; G.L. 7; $p \leq 0,001$) e ambas as concentrações de BAP apresentaram o maior valor (2,4) em relação às demais citocininas (FIGURA 8A).

No término do primeiro subcultivo, novamente houve formação de novos brotos. Os valores obtidos na presença de BAP, ZEA e com 2,2 μM de 2-iP foram mais elevados que no controle e das demais citocininas (X^2 4,382; G.L. 7; $p \leq 0,001$), chegando a 88% (FIGURA 8AB). O NMB foi mais alto nos tratamentos com BAP sendo 4,0 e 3,5, seguidos de ZEA com 2,3 e 2,5 (X^2 2,674; G.L. 7; $p \leq 0,001$). As demais citocininas tiveram valores menores e foram iguais ao do controle (FIGURA 8C-D).

No segundo subcultivo, os valores de SFB foram iguais para BAP e ZEA. Novamente foram os maiores (98%) e diferiram dos demais tratamentos (X^2 4,553; G.L. 7; $p \leq 0,001$). Na presença das demais citocininas, os valores foram iguais entre si e ao controle. O NMB mais alto foi 3,1 no tratamento com 4,4 μM de BAP e o segundo maior valor (2,3) foi com 2,2 μM desta mesma citocinina. Os tratamentos com ZEA tiveram valores mais baixos que aqueles obtidos na presença de BAP, porém diferiram das demais citocininas que apresentaram os valores mais baixos e foram iguais ao controle (X^2 4,553; G.L. 7; $p \leq 0,001$) (FIGURA 7A-B).

No final do terceiro subcultivo, os tratamentos com ZEA, BAP, 4,4 μM de 2-iP e 4,4 μM de KIN tiveram os maiores valores de SFB, chegando a 100% (X^2 4,382; G.L. 7; $p \leq 0,001$). Já o NMB foi maior nos tratamentos com BAP e ZEA, bem como o tratamento sem citocininas com valor máximo de 2,0 (X^2 2,165; G.L. 7; $p \leq 0,001$) (FIGURA 7A-B).

Neste experimento, houve interação entre os fatores (tipo de citocinina e suas concentrações: $p \leq 0,001$) tanto para SFB quanto para o NMB durante todos os cultivos. Em relação à evolução ao longo dos subcultivos, vemos que os valores de SFB dos tratamentos com BAP e ZEA mantiveram-se como os mais elevados e iguais entre si durante todos os subcultivos (FIGURA 7A-B).

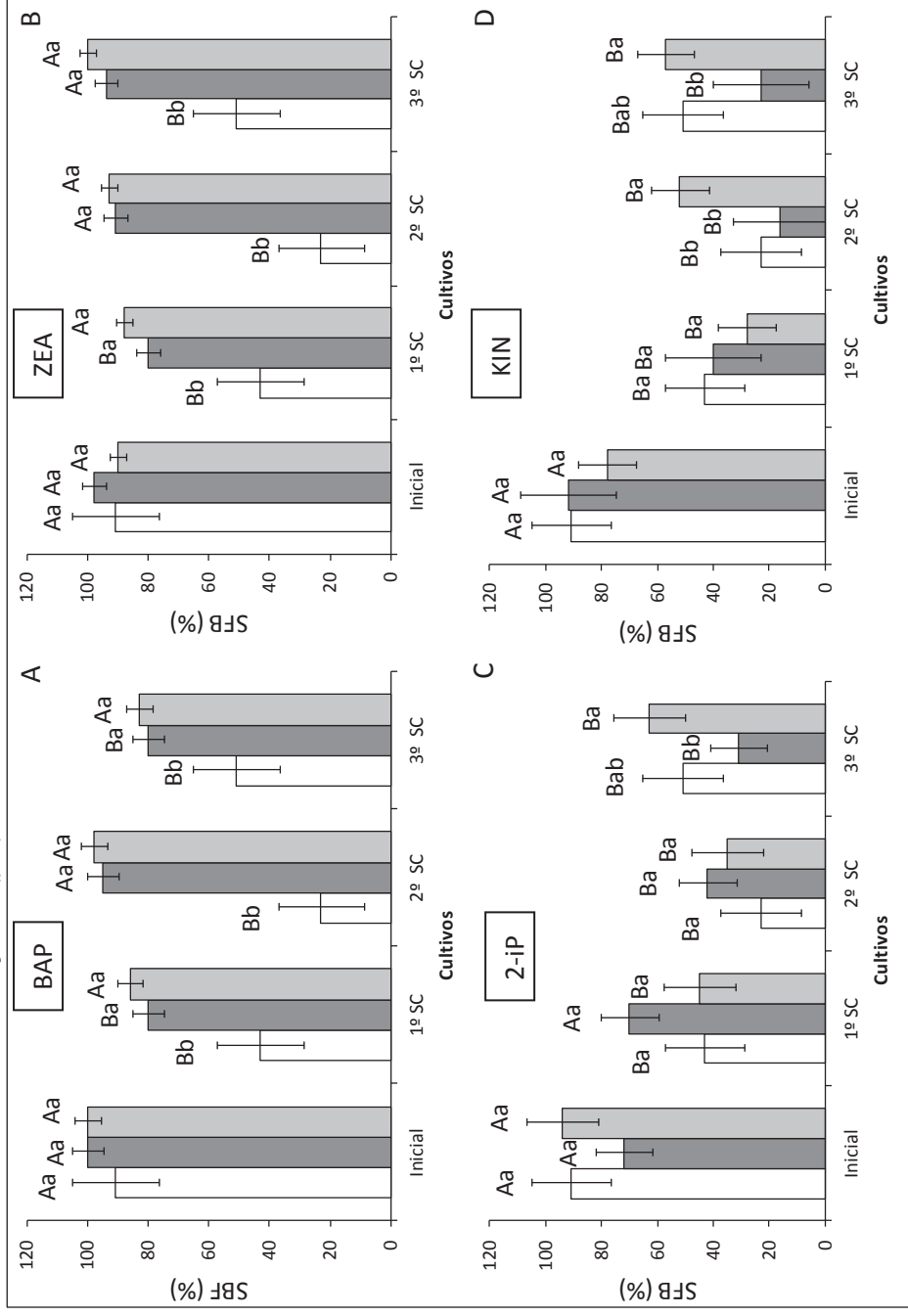
Os explantes cultivados nos meios contendo KIN e 2-iP geralmente apresentaram os menores valores de SFB e NMB que tenderam a variar entre os subcultivos. No final do primeiro subcultivo, os valores foram iguais para ambas citocininas e/ou menores que o controle. Nos demais subcultivos, os resultados obtidos com a concentração de 2,2 μM mantiveram-se enquanto que, na concentração de 4,4 μM , ocorreu um aumento e os valores maiores de SFB igualaram os das demais citocininas (FIGURA 8C-D)

No cultivo inicial, todas as citocininas apresentam valores maiores de NMB que o controle e, no decorrer dos subcultivos, estes valores acabaram se igualando ou sendo maiores que os valores obtidos na presença de algumas citocininas como 2-iP e KIN.

O NMB obtido nos tratamentos com BAP manteve-se isoladamente o mais elevado em relação às demais citocininas até o final do segundo subcultivo. Isto ocorreu até o terceiro subcultivo onde os valores observados na presença de BAP se igualaram as obtidos em ZEA e no controle. No meio contendo 2,2 μM de BAP, os valores de NMB não variaram entre os subcultivos e no meio com 4,4 μM de BAP houve variação apenas no último subcultivo onde o valor foi menor em relação aos anteriores (FIGURA 7A).

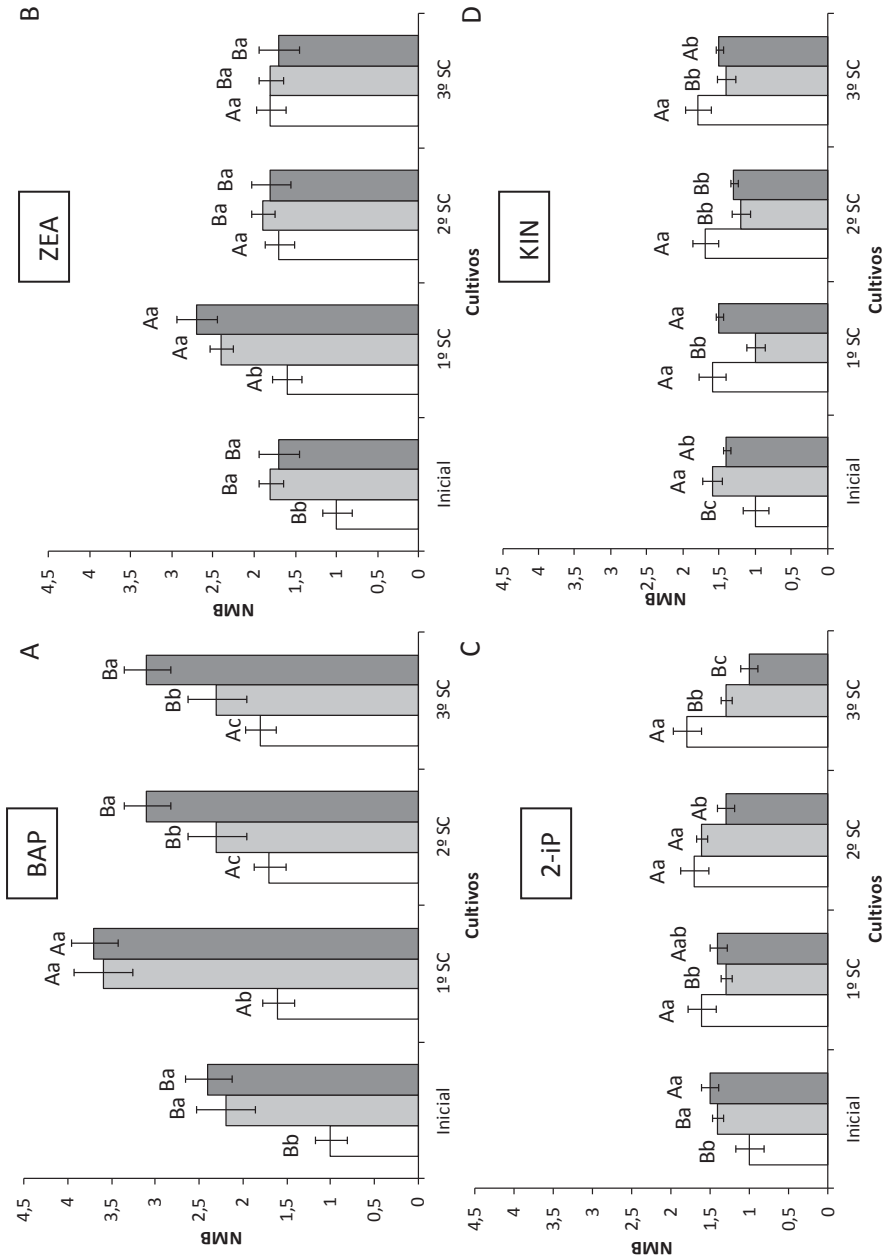
No meio contendo ZEA, os valores de NMB foram os segundos maiores no primeiro e segundo subcultivos e, no final do terceiro, foram similares aos do meio com BAP e ao controle. Todavia estes valores não diferiram durante todo o cultivo.

FIGURA 7 – FORMAÇÃO DE BROTO NOVOS EM *Campomanesia xanthocarpa* EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CITOCININAS E SUAS CONCENTRAÇÕES (μM) AO LONGO DE TRÊS SUBCULTIVOS EM MEIO WPM



A. BAP; B: ZEA; C: 2-IP; D: KIN. COLUNAS BRANCAS: CONTROLE; CINZA ESCURO: 2,2 μM ; CINZA CLARO: 4,4 μM . LETRAS IGUAIS ACIMA DAS COLUNAS NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. LETRAS MAÍSCULAS: ENTRE OS CULTIVOS; MINÚSCULAS: ENTRE AS CONCENTRAÇÕES NO MESMO CULTIVO. BARRAS REPRESENTAM \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018)

FIGURA 8 – NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR SEGMENTO NODAL (NMB) EM *Campomanesia xanthocarpa* AO LONGO DE TRÊS SUBCULTIVOS EM MEIO WPM CITOCININAS E SUAS CONCENTRAÇÕES (µM)

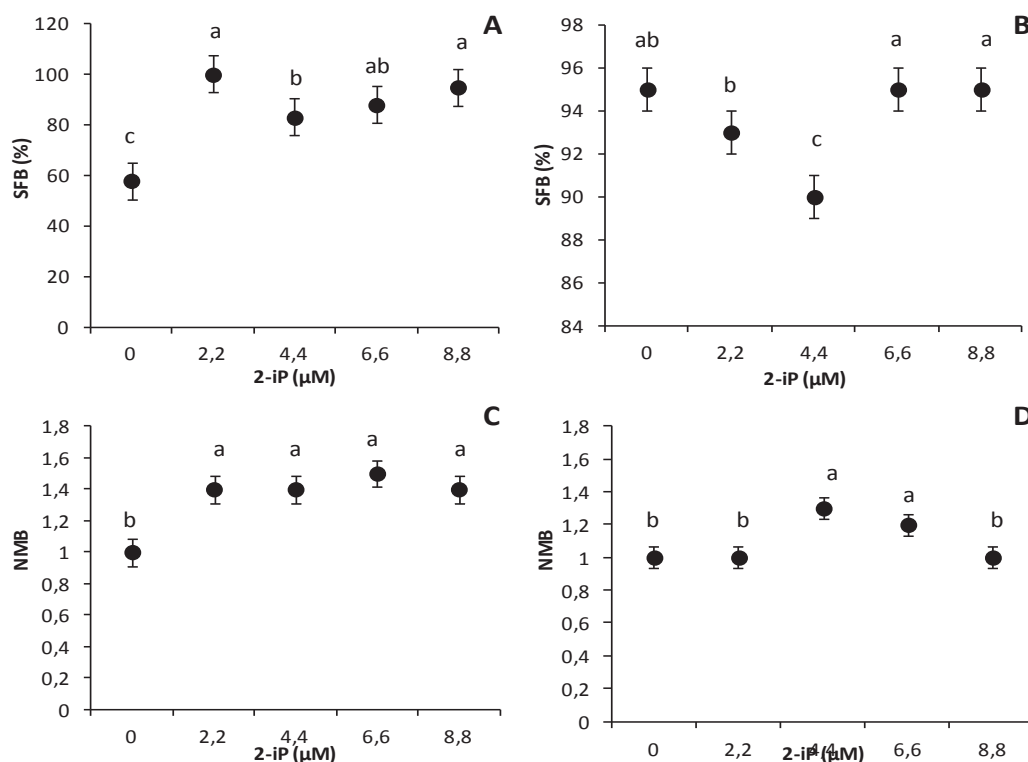


A. BAP; B. ZEA; C. 2-iP; D. KIN. COLUNAS BRANCAS: CONTROLE; CINZA ESCURO: 2,2 µM; CINZA CLARO: 4,4 µM. LETRAS IGUAIS ACIMA DAS COLUNAS NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM P ≤ 0,001. LETRAS MAÍSCULAS: ENTRE OS CULTIVOS; MINÚSCULAS: ENTRE AS CONCENTRAÇÕES NO MESMO CULTIVO. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

No experimento com 2-iP, os valores de SFB diferiram entre os tratamentos no final do cultivo inicial (X^2 110,56; G.L. 4; $p \leq 0,001$). Todos os meios suplementados com 2-iP tiveram SFB maiores em relação ao controle e as concentrações 2,2, 6,6 e 4,4 μM apresentaram o maior valor, chegando a 100% (FIGURA 9A). O NMB neste período foi maior nos tratamentos com 2-iP em relação ao controle (X^2 16,203; G.L. 4; $p \leq 0,001$), porém sem diferença entre as concentrações com um máximo de 1,5 (FIGURA 9B).

Após 30 dias de subcultivo, os valores mais altos de SFB foram encontrados nas concentrações 6,6 e 8,8 μM de 2-iP bem como no controle (X^2 76,227; G.L. 4; $p \leq 0,001$), com um máximo de 95% (FIGURA 9B). Os valores de NMB mais altos (X^2 15,901; G.L. 4; $p \leq 0,001$) foram 1,3 e 1,2 obtidos nas concentrações de 4,4 e 6,6 μM de 2-iP (respectivamente) (FIGURA 9C).

FIGURA 9 - FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM SEGMENTOS NODAIS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADOS POR 30 DIAS EM MEIO WPM ADICIONADO DE 0,1% DE PPM E 30 DIAS DE SUBCULTIVO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-IP.



A,C: CULTIVO INICIAL; B,D: SUBCULTIVO. SFB: SEGMENTOS FORMANDO BROTOS (%). NMB: NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR EXPLANTE COM BROTO. DADOS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $p \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO FONTE: O Autor (2018).

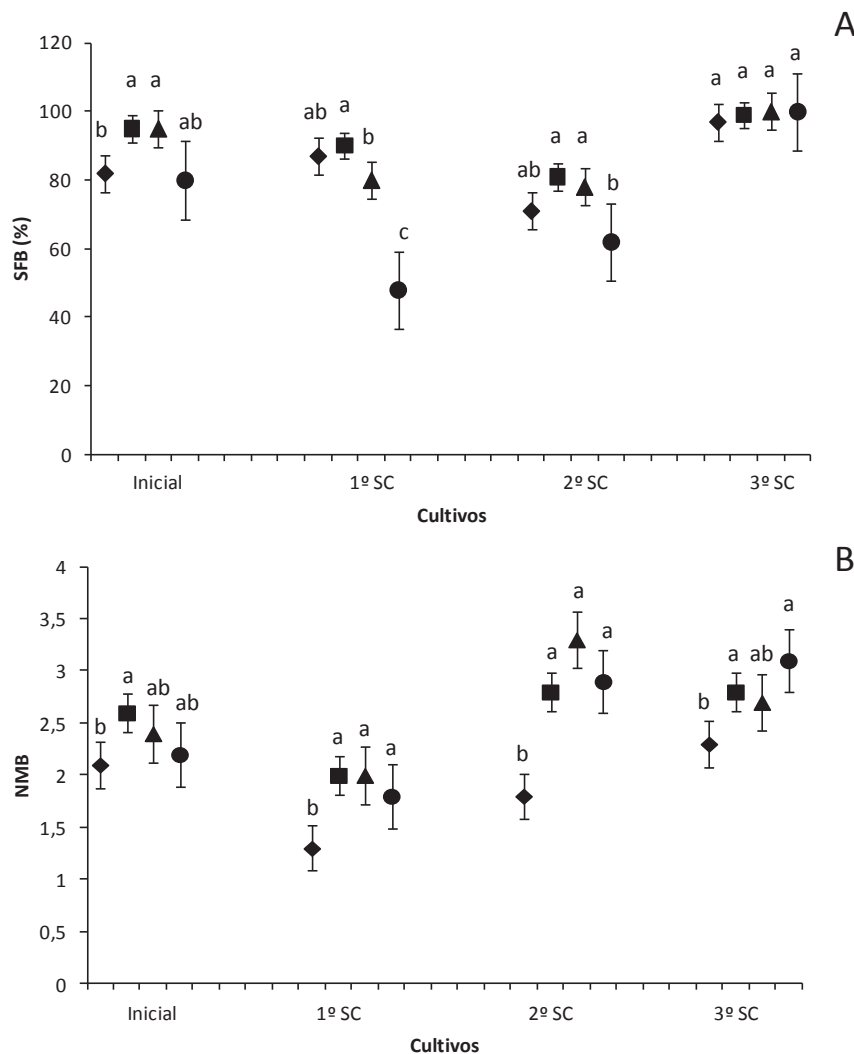
No experimento com BAP, ao término de 30 dias de cultivo, os explantes cultivados em meios contendo 2,2 e 4,4 μM apresentaram o maior valor de SFB (95%) e diferiram dos demais tratamentos (X^2 19,548; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 10A). O NMB mais elevado (X^2 25,161; G.L. 3; $p \leq 0,001$) foi 2,6 e também foi obtido nestas concentrações (FIGURA 10B). No primeiro subcultivo, todos os tratamentos (exceto 6,6 μM), tiveram valores altos de SFB, variando entre 80 a 90% (X^2 170,95; G.L. 3; $p \leq 0,001$) e o NMB diferiu do controle em relação às concentrações de BAP (X^2 36,832; G.L. 3; $p \leq 0,001$) chegando até o valor de 2,4 (FIGURA 10B).

Após o segundo subcultivo, os valores de SFB (X^2 32,822; G.L. 3; $p \leq 0,001$) e NMB (X^2 58,95; G.L. 3; $p \leq 0,001$) foram semelhantes aos obtidos no primeiro subcultivo, onde os explantes cultivados no controle e nas concentrações 2,2 e 4,4 μM tiveram valores mais altos e iguais entre si com máximo de 81% e diferindo apenas do tratamento com 6,6 μM que apresentou o menor valor para SFB (62%) (FIGURA 10A). O NMB neste cultivo foi maior nos tratamentos suplementados com BAP chegando até 3,3 (FIGURA 10B).

No final do terceiro subcultivo, os explantes cultivados na presença de BAP tiveram maior SFB com até 100%, e diferiram do controle com excessão do tratamento com 2,2 μM , que teve valores intermediários (X^2 4,57; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 10A). O NMB dos tratamentos suplementados com BAP foi maior em relação ao controle (X^2 51,262; G.L. 3; $p \leq 0,001$). Os valores mais altos (3,1 e 2,8) foram obtidos nas concentrações 2,2, 6,6 μM (respectivamente) enquanto que 4,4 μM apresentou valores intermediários entre estas duas concentrações (FIGURA 10B).

A concentração 6,6 μM de BAP apresentou valores baixos de SFB em relação às demais até o segundo subcultivo. BAP 2,2 e 4,4 μM tiveram maior SFB e mantiveram o mesmo padrão durante todos os cultivos. Já o NMB, todos os tratamentos do primeiro subcultivo tiveram valores menores e diferiram dos demais. O cultivo inicial, segundo e terceiro subcultivos, tiveram valores mais altos e semelhantes para o NMB durante o período analisado (FIGURA 10B).

FIGURA 10 - BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM GEMAS AXILARES DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS EM MEIO WPM COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP DURANTE TRÊS SUBCULTIVOS

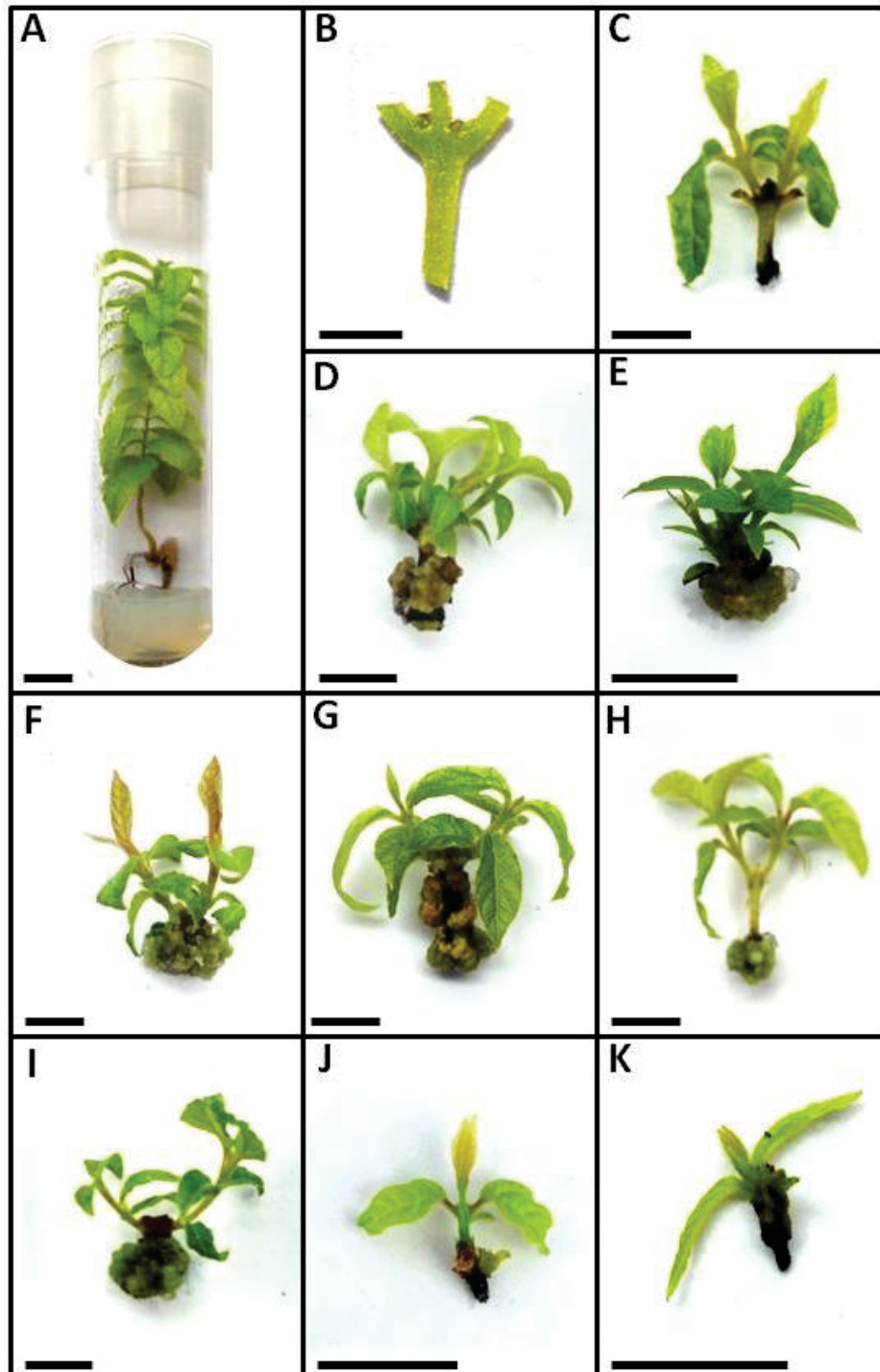


A: SFB: SEGMENTOS FORMANDO BROTOS (%); B: NMB: NÚMERO MÉDIO DE BROTOS. LOSÂNGO: CONTROLE; QUADRADO: 2,2 µM; TRIÂNGULO: 4,4 µM; CÍRCULO: 6,6 µM. DADOS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

Os explantes cultivados na presença de BAP (FIGURA 11D,E) e ZEA (FIGURA 11F,G) tiveram fenótipo normal semelhante aos cultivados no controle sem citocininas (FIGURA 11C). Em meio com KIN (Figura 11H, I) o fenótipo foi normal, porém com baixo SFB. Por outro lado, os explantes cultivados na presença de 2-iP (Figura 11J, K) tiveram visível redução da

formação de novos brotos e oxidação. Não foi necesserária a fase de alongamento.

FIGURA 11 - MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES EM *Campomanesia xanthocarpa*



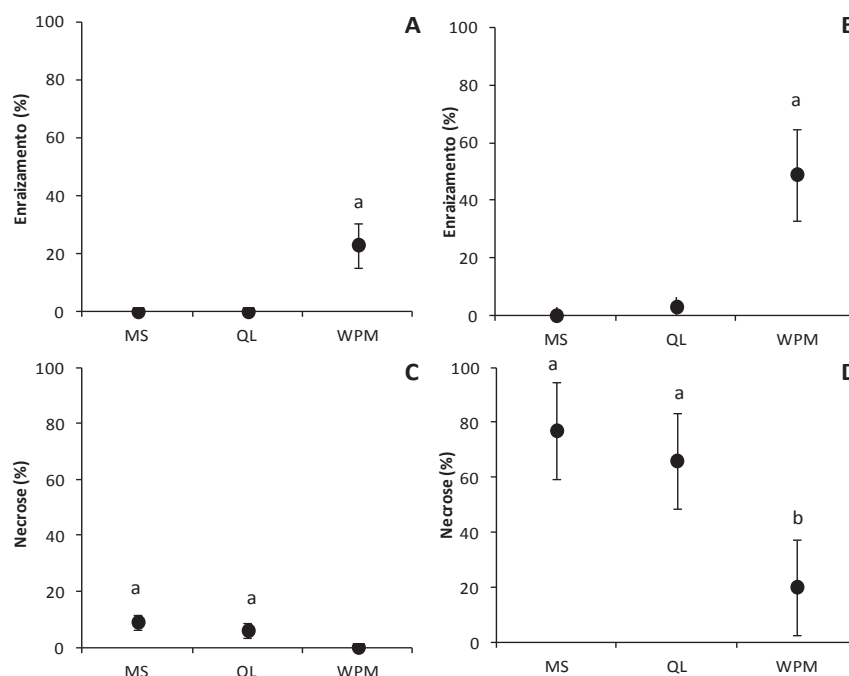
A: PLANTA OBTIDA DE SEMENTE GERMINADA IN VITRO; B: EXPLANTE INICIAL CONTENDO DUAS GEMAS AXILARES; C-K: BROTAÇÃO EM MEIO WPM: C: SEM REGULADORES; D: COM 2,2 μ M DE BAP; E: COM 4,4 μ M DE BAP; F: COM 2,2 μ M DE ZEA; G: 4,4 μ M DE ZEA; H: 2,2 μ M KIN; I: 4,4 μ M KIN; J: 2,2 μ M DE 2-IP E K: 4,4 μ M DE 2-IP. BARRAS: UM CENTÍMETRO. FONTE: O Autor (2018).

4.3 ENRAIZAMENTO

Nos experimentos com diferentes meios de cultura, a percentagem de enraizamento diferiu entre os tratamentos (X^2 351,56; G.L. 9; $p \leq 0,001$) e o meio WPM foi o que apresentou maior valor com 23% após 30 dias. Nos meios MS e QL, não houve formação de raízes ao término deste período (FIGURA 12A). Foi observada necrose das microestacas cultivadas nos meios QL e MS (6 e 9% respectivamente) (FIGURA 12C).

Após 60 dias, o meio WPM continuou com a maior percentagem de microestacas enraizadas (49%), enquanto que no meio QL houve apenas 9% e o meio MS não apresentou enraizamento (X^2 636,52; G.L. 9; $p \leq 0,001$) (FIGURA 12B). As percentagens de necrose aumentaram em todos os tratamentos após 60 dias. Os meios QL e MS apresentaram 66 e 77% de necrose enquanto que o meio WPM teve apenas 20% (FIGURA 12D).

FIGURA 12 - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE *Campomanesia xanthocarpa* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA ADICIONADO DE 0,1% DE PPM E DESPROVIDO DE REGULADORES, APÓS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO



A-B: ENRAIZAMENTO (%); C-D: NECROSE (%). A, C: 30 DIAS; B, D: 60 DIAS. DADOS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

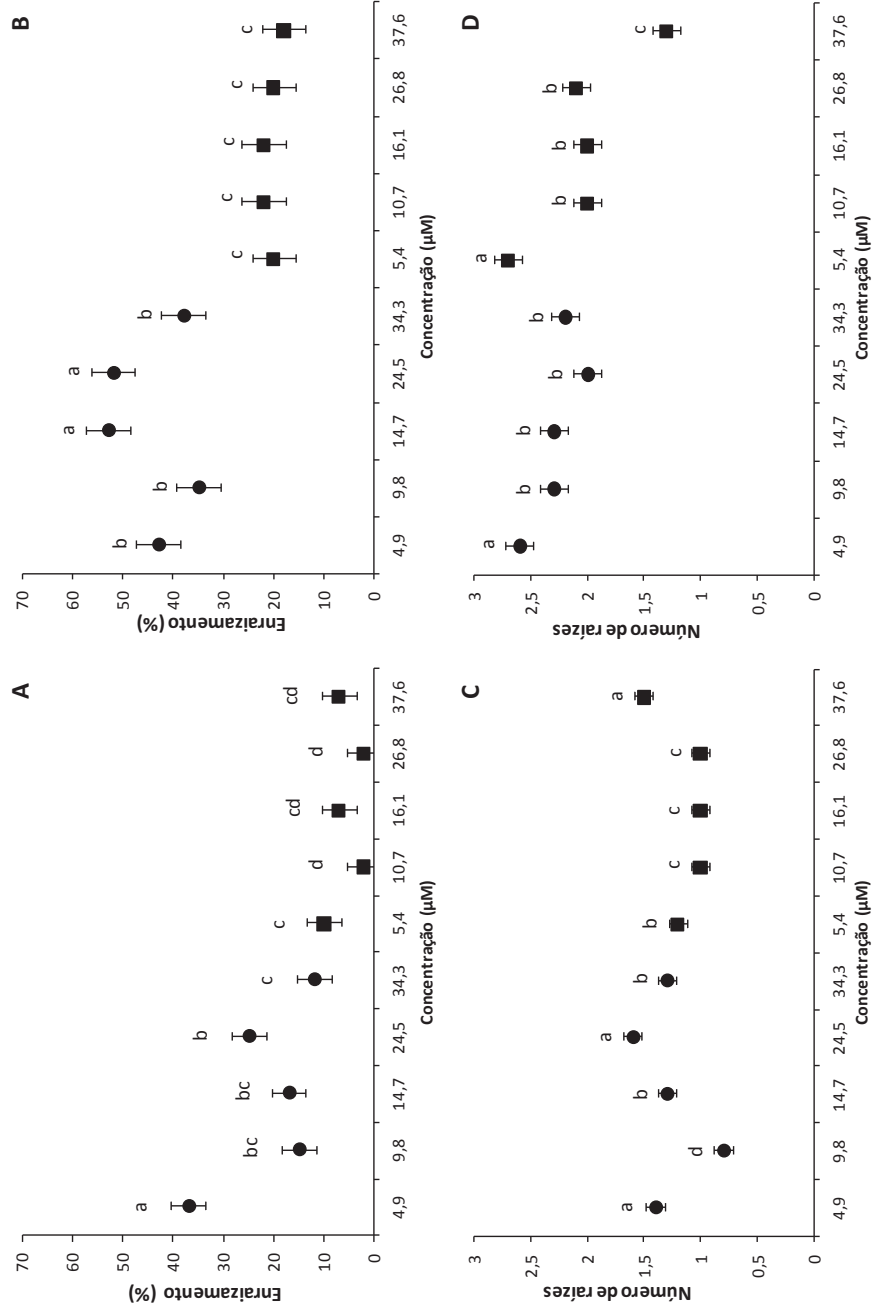
As primeiras raízes começaram a surgir aproximadamente em 20 dias e continuaram a aparecer durante o cultivo. Após 30 dias, houve maior desenvolvimento e a formação de raízes (%) atingiu um valor máximo em 60 dias. Depois deste período, não foi observada nova formação de raízes e as formadas continuaram se desenvolvendo e crescendo normalmente.

No experimento onde AIB e ANA foram adicionados ao meio de cultura, ao término de 30 dias de cultivo, a maior percentagem de enraizamento foi 37% e foi obtida no tratamento com 4,9 μM de AIB (X^2 944,19; G.L. 9; $p \leq 0,001$) (FIGURA 13A). Os tratamentos com ANA tiveram valores mais baixos de enraizamento com no máximo 10% (FIGURA 13A). Após 60 dias de cultivo, as percentagens de enraizamento foram maiores nos tratamentos contendo 14,7 e 24,5 μM de AIB com 52 e 53% respectivamente, seguidos das demais concentrações de AIB (X^2 925,81; G.L. 9; $p \leq 0,001$). Novamente, os tratamentos com ANA apresentaram os menores valores no enraizamento da guabirobeira (FIGURA 13B).

O número médio de raízes por explante após 30 dias apresentou variação entre os tratamentos e os mais altos foram entre 1,4 e 1,7 nas concentrações de 4,9 e 24,5 μM de AIB bem como em 37,6 μM de ANA (X^2 412,28; G.L. 9; $p \leq 0,001$) (FIGURA 13C). No final do cultivo (60 dias), o maior número médio de raízes foi obtido nas concentrações mais baixas de AIB e ANA (X^2 437,90; G.L. 9; $p \leq 0,001$) sendo em média 2,6 e 2,7 respectivamente. Os demais tratamentos tiveram médias iguais com valor máximo de 2,3, exceto na concentração de 37,6 μM de ANA que teve apenas 1,3 e foi o menor valor obtido (FIGURA 13D).

Durante todo o cultivo, houve interação entre os fatores (tipos de auxina e suas concentrações: $p \leq 0,001$) tanto para a percentagem de enraizamento quanto para o número médio de raízes por microestaca enraizada.

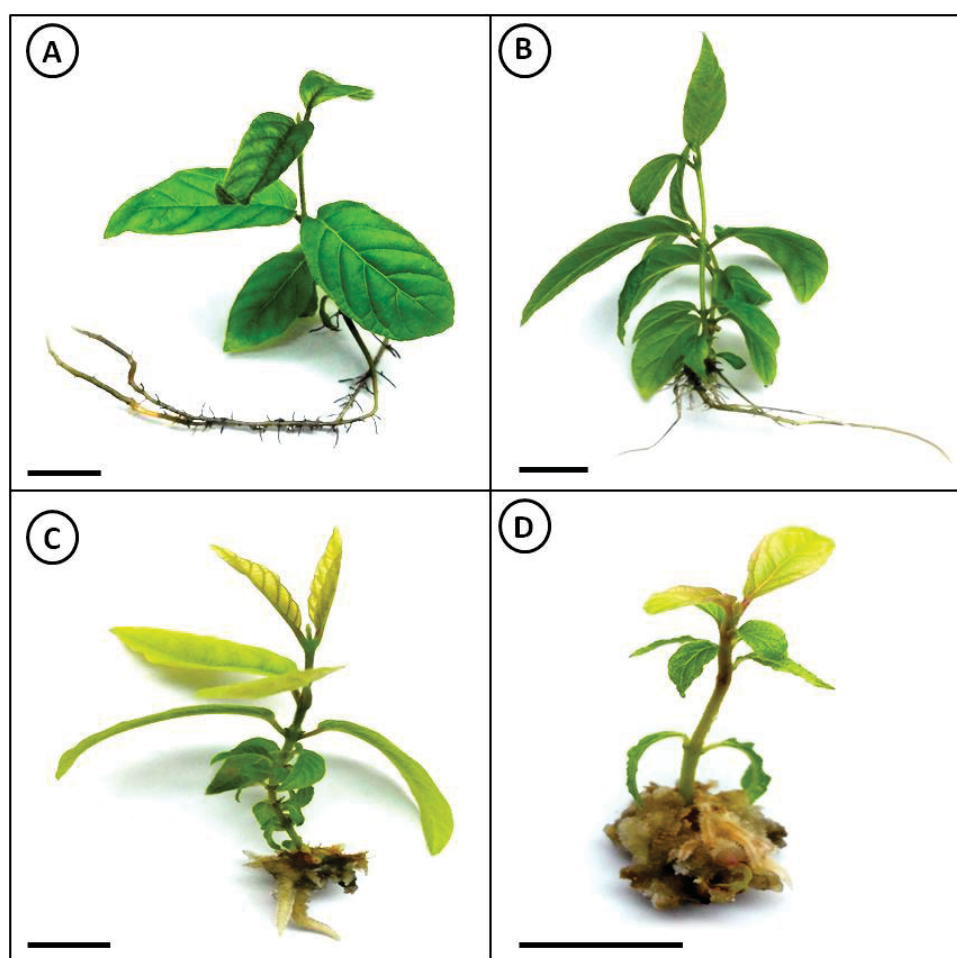
FIGURA 13 - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE *Campomanesia xanthocarpa* EM FUNÇÃO DO TIPO DE AUXINA E CONCENTRAÇÃO EM MEIO WPM ADICIONADO DE 0,1% DE PPM, APÓS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO



A-B: ENRAIZAMENTO; C-D: NÚMERO MÉDIO POR MICROESTACA QUE FORMOU RAÍZES. A,C: 30 DIAS. B,D: 60 DIAS. CÍRCULOS: ÁCIDO-INDOLBUTÍRICO; QUADRADOS: ÁCIDO NAFTALENO-ACÉTICO. DADOS COM A MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

As microestacas cultivadas na presença de AIB tinham calos apenas nas concentrações mais altas, folhas mais clorofiladas, plantas mais vigorosas e com tamanho visivelmente maior que as plantas em meio contendo ANA (FIGURA 14A-B). Além da baixa percentagem de enraizamento, os explantes cultivados nos meios contendo ANA apresentaram formação de calos na base, tamanho reduzido e folhas cloróticas em todas as concentrações testadas (FIGURA 14C-D). Portanto, os demais experimentos de enraizamento foram realizados apenas com diferentes concentrações de AIB.

FIGURA 14 - ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE MICROESTACAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS EM MEIO WPM SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB E ANA DURANTE 60 DIAS

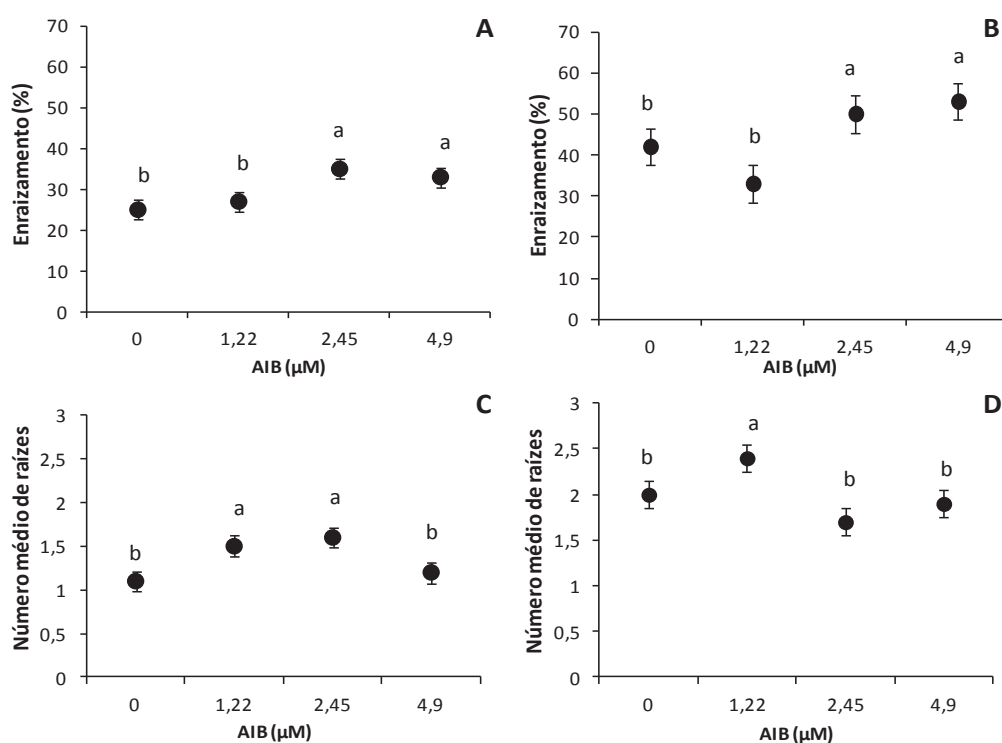


A: 4,9 µM DE AIB; B: 24,5µM DE AIB; C: 5,37 µM DE ANA E D: 26,8 µM DE ANA. BARRAS: UM CENTÍMETRO. FONTE: O Autor (2018).

No experimento onde concentrações mais baixas de AIB foram utilizadas, após 30 dias, houve formação de raízes em todos os tratamentos e as maiores percentagens foram 35 e 32%, obtidas nos meios suplementados com 2,45 e 4,9 μM de AIB respectivamente (X^2 29,001; G.L. 3; $p \leq 0,001$). O número médio de raízes mais alto foi 1,5 e 1,6 encontrados em 1,22 e 2,45 μM respectivamente (X^2 12,221; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 15A-B).

Após 60 dias, a taxa de enraizamento foi semelhante aos 30 dias, onde as concentrações 2,45 e 4,9 μM de AIB apresentaram a maior percentagem de enraizamento com 50 e 53% (X^2 66,673; G.L. 3; $p \leq 0,001$). O número médio de raízes mais alto foi 2,4 % (X^2 23,506; G.L. 3; $p \leq 0,001$) e foi obtido em 1,22 μM de AIB (FIGURA 15). Não houve diferença para a percentagem de enraizamento e número médio de raízes em relação a 30 e 60 dias de cultivo %.(X^2 259,081; G.L. 7; $p = 0,006$) (FIGURA 15C-D).

FIGURA 15 - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS EM MEIO WPM SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (μM) DE AIB DURANTE 30 E 60 DIAS

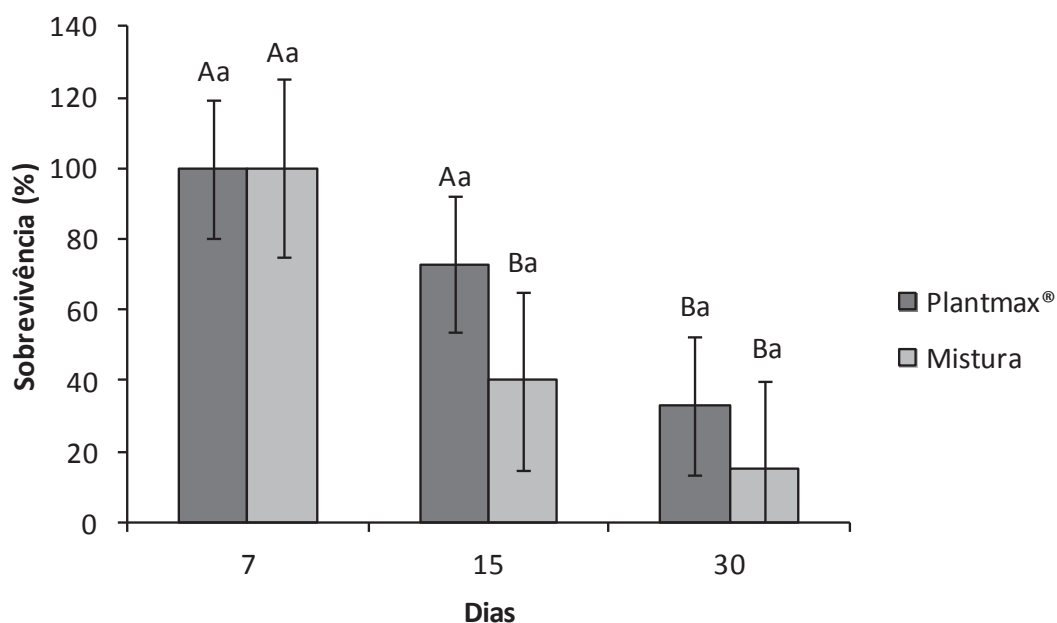


A-B: ENRAIZAMENTO (%); C-D: NÚMERO MÉDIO POR MICRO-ESTACA. A,C: 30 DIAS; B,D: 60 DIAS. TODOS OS MEIOS CONTINHAM 0,1% DE PPM. DADOS COM A MESMA LETRA ACIMA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

4.4. ACLIMATIZAÇÃO

No primeiro experimento, todas as plantas sobreviveram após uma semana (X^2 7,157; GL 1; $p > 0,001$). Após a remoção total do plástico filme, houve morte das plantas em ambos os substratos. No final de 30 dias, a taxa de sobrevivência não diferiu entre os substratos (X^2 18,76; GL 1; $p > 0,001$) e o valor mais alto de sobrevivência foi 33% (FIGURA 16). Em relação aos dias de aclimatização, houve diferença apenas entre os 30 e 7 dias de cultivo (X^2 40,67; GL 1; $p < 0,001$).

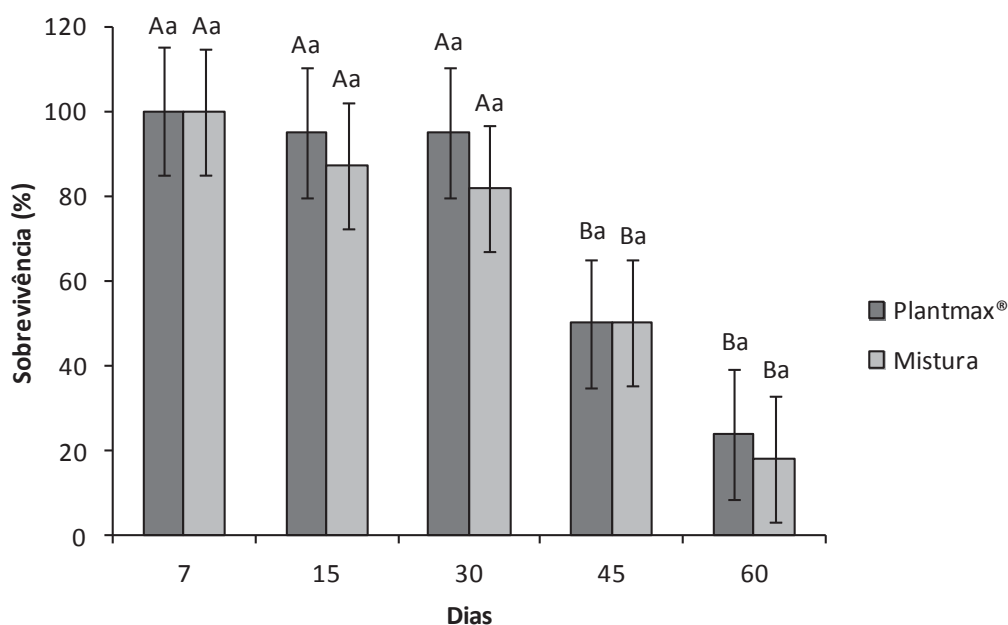
FIGURA 16 - SOBREVIVÊNCIA *EX VITRO* DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Campomanesia xanthocarpa* EM DOIS SUBSTRATOS E COM COBERTURA DE FILME DE PVC, AVALIADA DURANTE 30 DIAS



MISTURA: SUBSTRATO PLANTMAX COMBINADO COM VERMICULITA DIMY (1:1 V/V)
 DADOS COM A MESMA LETRA NA COLUNA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$; LETRAS MINÚSCULAS: ENTRE OS SUBSTRATOS; MAÍUSCULAS: ENTRE OS PERÍODOS DE TEMPO. BARRAS REPRESENTAM \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

No experimento com a caixa plástica, todas as plantas sobreviveram durante os primeiros sete dias. Não houve diferença na taxa de sobrevivência entre os substratos durante todo o período analisado (X^2 40,67; GL 1; $p > 0,001$) e, após 60 dias, os maiores valores obtidos foram 50 e 57% no Plantmax e na mistura, respectivamente (FIGURA 17). Em relação ao decorrer dos dias de aclimatização, houve uma diminuição nas taxas de sobrevivência após um mês e os valores obtidos em 45 e 60 dias foram os mais baixos e diferiram em relação aos primeiros 30 dias (X^2 78,57; GL 1; $p \leq 0,001$)

FIGURA 17- SOBREVIVÊNCIA *EX VITRO* DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS EM CAIXA PLÁSTICA E EM DOIS SUBSTRATOS DURANTE 60 DIAS COM ABERTURA GRADUAL DA CAIXA APÓS SETE DIAS E TOTAL APÓS 30 DIAS



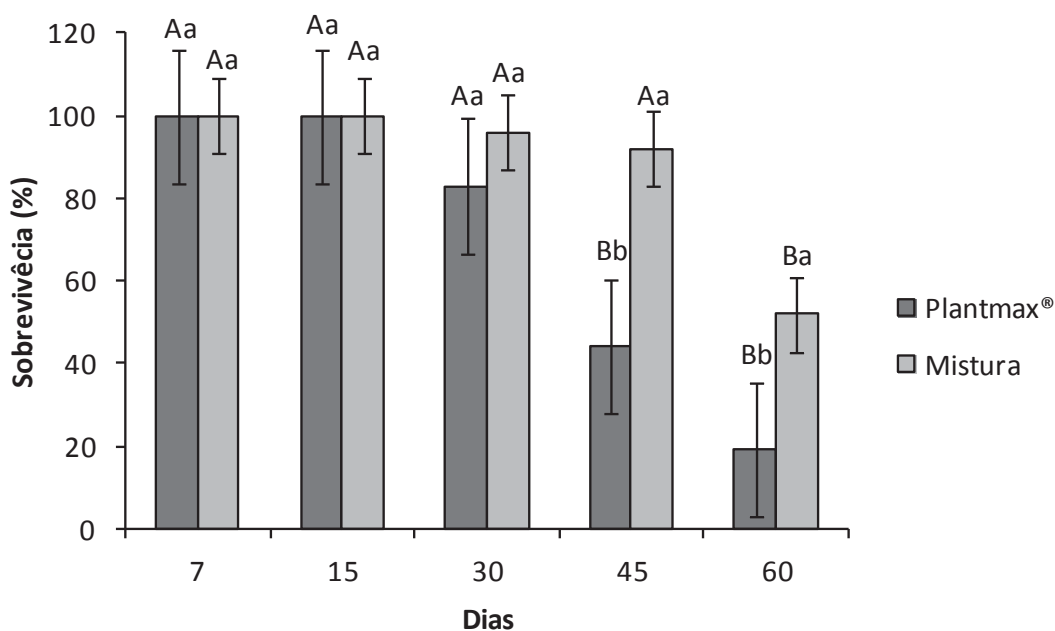
MISTURA: PLANTMAX® COMBINADO COM VERMICULITA 1:1 (V/V). DADOS COM A MESMA LETRA NA COLUNA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. ; LETRAS MINÚSCULAS: ENTRE OS SUBSTRATOS; MAÍUSCULAS: ENTRE OS PERÍODOS DE TEMPO. BARRAS REPRESENTAM \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018)

Na repetição deste experimento, as plantas tiveram 100% de sobrevivência nos dois substratos durante os 15 dias em que a caixa permaneceu fechada. Após este período, várias plantas morreram principalmente no substrato Plantmax (FIGURA 18).

Após 45 dias, houve diferença na taxa de sobrevivência entre os substratos (X^2 20,98; GL 1; $p \leq 0,001$) e a mistura entre Plantmax com vermiculita apresentou a maior percentagem de plantas sobreviventes (92%) em relação ao tratamento contendo apenas substrato Plantmax. Resultado semelhante ocorreu após 60 dias de aclimatização (FIGURA 18).

Em relação ao período de aclimatização, a mistura apresentou diferença e foi menor apenas nos 60 dias, enquanto que o substrato Plantmax teve taxas baixas e diferiu em 45 e 60 dias comparado com o início do cultivo (X^2 80,89; GL 1; $p \leq 0,001$) (FIGURA 18).

FIGURA 18 - SOBREVIVÊNCIA *EX VITRO* DAS PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS EM CAIXA PLÁSTICA EM DOIS SUBSTRATOS DURANTE 60 DIAS COM ABERTURA GRADUAL APÓS 15 DIAS E TOTAL EM 30 DIAS

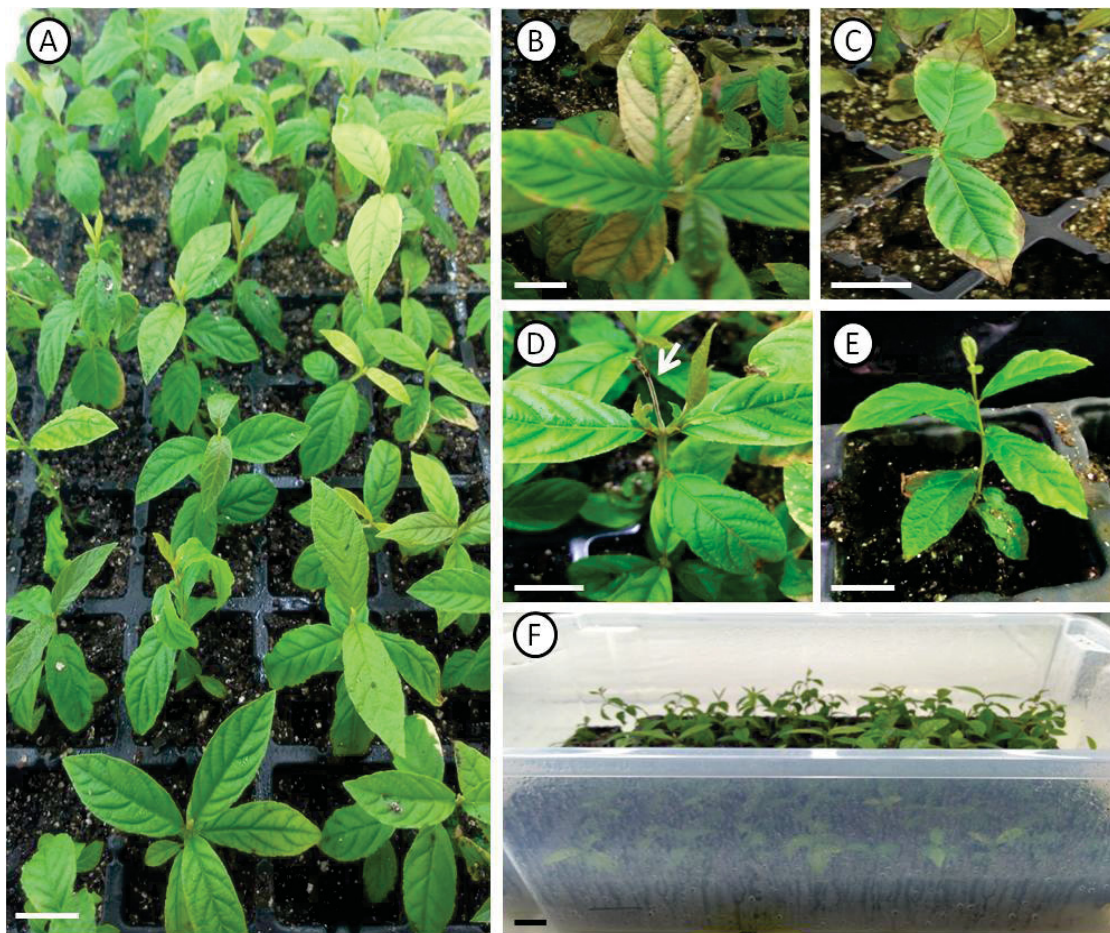


MISTURA: PLANTMAX® COMBINADO COM VERMICULITA 1:1 (V/V). DADOS COM A MESMA LETRA NA COLUNA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY $P \leq 0,001$. ; LETRAS MINÚSCULAS: ENTRE OS SUBSTRATOS; MAÍUSCULAS: ENTRE OS PERÍODOS DE TEMPO BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

Durante a aclimatização das plântulas, foram observados diferentes sintomas de deficiência nutricional, como a clorose internerval (FIGURA 19 B), ápice foliar queimado (FIGURA 19 C) e necrose do ápice caulinar (FIGURA 19 D) em ambos os substratos.

O fenótipo das plantas que sobreviveram após 60 dias de aclimatização era normal, as plantas vigorosas e clorofiladas. Com estas plantas, foi possível realizar o cultivo em casa de vegetação fora da caixa plástica e, neste caso, foi observada a sobrevivência após 90 dias (FIGURA 19 E).

FIGURA 19 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS DE *Campomanesia xanthocarpa*



A: INÍCIO DO CULTIVO; B-D: SINTOMAS DE DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL; SETA: NECROSE APICAL; E: PLANTA ACLIMATIZADA APÓS 90 DIAS; F: CULTIVO DENTRO DE CAIXA PLÁSTICA. BARRAS: 1,5 CENTÍMETROS. FONTE: O Autor (2018).

5. DISCUSSÃO

5.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

O PPM na concentração indicada pelos fabricantes (0,1%) foi eficaz para prevenir as contaminações durante o estabelecimento das culturas assépticas. Nos tratamentos contendo o biocida, não foram observadas quaisquer contaminações, seja por bactérias ou fungos durante todo o período analisado.

Estudos anteriores relataram problemas na micropropagação de *Campomanesia xanthocarpa* devido a contaminações das culturas por bactéria endofítica resistente aos processos de desinfestação (SCUTTI e ZANETTE, 2000). Essa contaminação bacteriana não foi detectada em nenhum momento do cultivo neste trabalho, o que mostra a eficiência do biocida. Além do efeito do PPM, o não aparecimento desta bactéria pode estar relacionado com a obtenção dos explantes a partir da germinação *in vitro*.

Contaminações por bactérias endofíticas são consideradas como um dos principais problemas do cultivo *in vitro* e já foram observadas em outras Myrtaceae como no araçá (*Psidium cattleianum*) (FREIRE, et al., 2018). Neste caso, mesmo com a utilização de explantes germinados *in vitro*, houve contaminação por bactéria endógena, sendo necessário adicionar ampicilina aos meios de cultura. Neste contexto, no presente estudo não foi necessário testar outros agentes desinfestantes mais tóxicos e/ou antibióticos adicionados aos meios de cultura. Isto torna o protocolo mais simples e fácil de ser reproduzido em relação às normas de biossegurança.

Aparentemente o PPM afetou pouco o desenvolvimento *in vitro* dos explantes de *C. xanthocarpa*. No entanto, para *Petunia hybrida* houve efeito negativo na formação de novas folhas na regeneração a partir de segmentos nodais (MYAZAKI et al. 2010). Em estudos realizados com crisântemo (*Dendranthema x grandiflora*), bétula (*Betula pendula*) e *Rhododendron catawbiense* houve redução e inibição da formação de novos brotos (GEORGE e TRIPEPI, 2001). Para *Vaccinium corymbosum*, houve menor alongamento dos brotos e concentrações mais altas (acima de 0,3%) foram letais para os explantes

(HUH et. al., 2015). Desta forma, é recomendado estudar o efeito deste biocida no desenvolvimento de cada espécie antes da sua utilização em larga escala.

5.2 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

5.2.1 EFEITO DA FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E DO BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS

Em relação às diferentes formulações dos meios de cultura (Anexo 1), o meio que permitiu maior desenvolvimento dos brotos e NMB, além da baixa taxa de oxidação e necrose, foi o WPM seguido do MS, QL e por último LPm.

Com base nestes resultados, *Campomanesia xanthocarpa* não necessita de elevadas concentrações de nitrogênio no meio de cultura, pois houve maior desenvolvimento dos explantes quando cultivados em meio WPM, onde este nutriente encontra-se em menor concentração. Outros fatores que podem ter influenciado estas respostas são a maior quantidade de cálcio e ausência de iodo e cobalto na formulação deste meio, assim como a maior quantidade de tiamina.

As vitaminas do meio MS também foram utilizadas nos meios QL e LPm. Nesta formulação, a única diferença é a concentração de tiamina que é mais baixa em relação ao meio WPM (Anexo 2). A tiamina é a vitamina mais comumente adicionada aos meios de cultura e, além de fornecer nitrogênio para os tecidos vegetais, possui funções ligadas ao metabolismo de carboidratos e biossíntese de aminoácidos (GEORGE *et al.*, 2008). Desta forma, a tiamina em maior concentração pode ser mais adequada para o desenvolvimento dos explantes.

Oxidações seguidas de morte dos explantes foram observadas principalmente nos meios LPm e MS, sendo as mais altas no meio LPm. Este fato pode estar relacionado com as elevadas concentrações de nitrogênio presentes nestas formulações, fato que corrobora a ideia que a espécie não necessita de nitrogênio em grandes quantidades. Embora o meio LPm seja utilizado para espécies florestais como *Pinus*, para *Campomanesia xanthocarpa* este meio não foi adequado visto que provocou baixa formação de novos brotos e alta

mortalidade dos explantes, o que pode também estar relacionado com as baixas concentrações de micronutrientes como ferro e zinco nesta formulação.

Muitos protocolos de micropropagação de Myrtaceae tiveram sucesso no estabelecimento e multiplicação dos explantes em meio MS como é o caso das espécies *Melaleuca alternifolia* (JALA e CHANCHULA, 2014), *P. cattleianum* (FREIRE, et al., 2017), *Psidium guajava* (MISHRA, et al., 2007) e *Syzygium cordatum* (DEWIR et al., 2011). No entanto, formulações com concentração de sais diluída, como o ½ MS, foram mais eficientes para *Eugenia uniflora* (SILVA et al., 2014) e *Eugenia involucra* (GOLLE et al., 2012). Enquanto que, para *Acca sellowiana* (ROSS e GRASSO, 2010) e *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008), o meio mais adequado foi WPM.

Desta forma, a resposta dos explantes em relação ao meio de cultura varia muito entre as mirtáceas até mesmo entre as espécies pertencentes ao mesmo gênero como ocorre em *Eugenia*.

5.2.2 EFEITO DAS CITOCININAS

A formação de novos brotos em *Campomanesia xanthocarpa*, variou em função do tipo de citocinina adicionada ao meio de cultura e a que promoveu maior taxa de multiplicação foi a BAP. Esta citocinina tem sido a mais utilizada na multiplicação de gemas de diversas espécies florestais (OLIVEIRA et al., 2013). BAP também foi a citocinina mais eficaz para outras mirtáceas nativas do Brasil, como *Campomanesia adamantium* (ROSSATO, et al., 2015), *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008), *Eugenia uniflora* (SILVA, et al., 2014) e *Psidium cattleianum* (FREIRE et al., 2017), bem como em espécies exóticas como *Melaleuca alternifolia* (JALA e CHANCHULA, 2014), *Myrtus communis* (PARRA e AMO-MARCO, 1996), *Psidium guajava* (MISHRA, et al., 2007) e *Syzygium alternifolium* (KHAN et al., 1998). Diferentemente, em *Acca sellowiana* nenhuma das citocininas testadas (BAP, 2-IP e KIN) teve efeito significativo para a formação de novos brotos e as taxas de multiplicação se igualaram às do controle sem citocininas (OLTRAMARI et al., 2000, ROSS e GRASSO, 2011).

Os explantes de *C. xanthocarpa* cultivados em meio contendo ZEA apresentaram morfologia normal com folhas verdes, a segunda maior taxa de multiplicação e, em alguns casos, valores iguais aos obtidos no meio com BAP. Porém, em nenhum protocolo consultado para mirtáceas, a ZEA foi utilizada durante essa etapa. Uma das explicações pode ser o elevado custo desta citocinina que torna o protocolo mais caro.

Em relação às concentrações de BAP, 2,2 e 4,4 μM proporcionaram os maiores valores de taxa de multiplicação em todos os experimentos, sendo 3,6 e 3,7 no primeiro subcultivo. Resultados semelhantes foram obtidos com estas concentrações em *Eugenia pyriformis* com NMB de 4 no cultivo inicial em meio contendo 4,4 μM de BAP (NASCIMENTO *et al.*, 2008) e em *Campomanesia adamantium* com NMB de 2 (ROSSATO *et al.*, 2015).

Diferentemente, concentrações mais altas de BAP foram mais eficientes em *Melaleuca alternifolia* (com NMB igual a 7,0 na presença de 13 μM JALA e CHANCHULA, 2014), *Syzygium alternifolium* (com 3,8 em 17,4 μM (KHAN *et al.*, 1998) e em *Psidium guajava* com NMB de 2,7 em 12 μM (MISHRA, *et al.*, 2007). No entanto, a concentração mais alta de BAP testada neste trabalho (6,6 μM), apresentou valores de NMB sem diferença em relação ao controle e possivelmente, concentrações mais altas teriam valores mais baixos. Este efeito já foi descrito por vários autores segundo os quais, conforme a concentração de citocinina aumenta, o NMB tende a diminuir e os novos brotos apresentam tamanho reduzido (GEORGE *et al.*, 2008).

Em relação aos subcultivos, observou-se que a taxa de multiplicação obtida na presença de BAP sofreu pouca variação no decorrer dos cultivos. Estas taxas também foram maiores que no cultivo inicial. Em *Syzygium alternifolium* (KHAN *et al.*, 1998), as taxas de multiplicação aumentaram até o terceiro subcultivo com valores de 4,6 a 8. Os demais trabalhos consultados não relataram ou não realizaram subcultivos.

Com base nestes protocolos utilizados para diferentes espécies de Myrtaceae, podemos observar que existe grande variação na resposta aos efeitos de BAP na formação de novas brotações. Todavia, em algumas

espécies, as respostas são mais semelhantes, como em *Eugenia pyriformis* que apresentou NMB igual a 4 em BAP (4,4 µM) e em *Campomanesia xanthocarpa* com NMB igual a 3,7 nesta mesma concentração.

5.3 ENRAIZAMENTO

Os explantes cultivados no meio MS sem auxina foram os que apresentaram menor taxa de enraizamento além de alta percentagem de oxidação seguida de morte dos explantes. Os melhores resultados foram obtidos com o uso do meio WPM com maior taxa de enraizamento das microestacas sem danos aos explantes. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores segundo os quais os meios de cultura com concentrações de sais minerais diluídas promovem aumento nas taxas de enraizamento (GEORGE *et al.*, 2008, OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A formação de raízes em explantes de *Campomanesia xanthocarpa* cultivados na ausência de reguladores vegetais já foi observada em experimentos prévios por Scutti e Zanette (2000), assim como em outras espécies de mirtáceas como *Acca sellowiana* (OLTRAMARI *et al.*, 2000), *Eugenia myrtifolia* (BLANDO *et al.*, 2013) e *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO *et al.*, 2008). O enraizamento em meio de cultura sem reguladores vegetais pode ser explicado pelo efeito fisiológico das auxinas endógenas presente nos explantes, que são capazes de induzir este processo. Nas plantas, a auxina é produzida nos ápices caulinares e foliares, transportada via polar pelo floema e, entre seus efeitos, estão o crescimento celular e o desenvolvimento de raízes (TAIZ *et al.*, 2016).

Todas as microestacas enraizadas em meio suplementado com ANA desenvolveram calos na base dos explantes, porte reduzido e folhas cloróticas. Esta morfologia anormal está relacionada com a presença do calo na base, que pode ter alterado a organização interna da raiz, interrompendo os tecidos vasculares e provocando uma baixa eficiência deste órgão. A formação de calos na base dos explantes pode ocorrer devido ao efeito das auxinas na

divisão celular. Este processo é indesejado na organogênese, pois apresenta efeitos negativos para as plantas enraizadas, como a dificuldade de absorção e transporte dos nutrientes (GEORGE et al., 2008). Desta forma, ANA não é recomendada para promover o enraizamento da guabirobeira.

Em Myrtaceae, comumente o AIB é utilizado para promover formação de raízes adventícias em microestacas, sem a ocorrência de calogênese. No enraizamento de *Campomanesia xanthocarpa*, esta auxina foi a que promoveu maior percentagem de formação de raízes e número médio de raízes sem a formação de calos após 30 e 60 dias de cultivo. O mesmo efeito de AIB (4,9 μ M) no enraizamento de *C. xanthocarpa* foi encontrado em *Eugenia involucra*, com 70% de enraizamento após 60 dias (GOLLE et al., 2012), em *Eugenia pyriformis*, com 60% após 40 dias (NASCIMENTO et al., 2004) e em *Syzygium cordatum* com 70% após 30 dias (DEWIR et al., 2011).

Concentrações mais altas deste regulador foram utilizadas em *Acca sellowiana* (OLTRAMARI et al., 2000) onde foi aplicado um tratamento pulso de 20 μ M de AIB durante três dias, que resultou em 52% de enraizamento após 30 dias. Em *Psidium guajava* (MISHRA et al., 2007) foi utilizado 49 μ M de AIB e houve formação de raízes após 17 dias. Nestes estudos, as concentrações mais altas de AIB por períodos de exposição menores foram capazes de induzir o enraizamento, porém as taxas obtidas nestas condições tiveram valores próximos aos encontrados neste trabalho com concentrações mais baixas (4,9 μ M) de AIB.

Desta forma, podemos inferir que concentrações mais baixas de AIB como 4,9 μ M induzem o enraizamento em *Campomanesia xanthocarpa*, sem fitotoxicidade nem calogênese e podem ser utilizadas por períodos de exposição mais longos. Outra vantagem de utilizar concentrações mais baixas é o menor gasto com auxina que consequentemente torna esta etapa mais econômica.

5.4 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS

A aclimatização em caixa plástica com abertura gradual foi mais eficiente para a sobrevivência das plântulas micropropagadas em relação ao uso da cobertura com plástico PVC. Isto pode estar relacionado com o fato da caixa permitir maior controle de umidade e intensidade luminosa de maneira uniforme a todas as mudas.

Muitos trabalhos recomendam períodos mais prolongados de abertura da cobertura/caixa antes da remoção completa e total exposição das plântulas às novas condições de cultivo. Este período prolongado pode aumentar as taxas de sobrevivência, como foi observado para *Campomanesia xanthocarpa* que teve 100% de sobrevivência após 15 dias, para *Eugenia pyriformis* com 85% (NASCIMENTO et al 2008) e *Syzygium alternifolium* (KHAN et al., 1998) com 70% após 21 dias.

A aclimatização com o uso de cobertura de plástico PVC ou caixa plástica pode auxiliar na adaptação das mudas às novas condições de cultivo como a umidade relativa do ar e temperatura. As perfurações/aberturas graduais fornecem, aos poucos, novas condições ambientais às mudas sem promover mudanças bruscas e altamente estressantes. Consequentemente, aumentam as taxas de sobrevivência destas plantas em relação às aclimatizadas diretamente em casa de vegetação (POSPISILOVÁ, et al., 2007).

A sobrevivência das mudas de guabiroba não diferiu entre os substratos durante 30 dias em todos os experimentos. O mesmo ocorreu em *Psidium cattleianum* (FREIRE, et al., 2018) que apresentou em média 80% de sobrevivência independente do substrato utilizado. No entanto, no último experimento, a mistura dos substratos Plantmax e vermiculita permitiu maior sobrevivência das mudas de guabiroba após 45 e 60 dias com máximo de 52% de plantas sobreviventes. Da mesma forma, na aclimatização de *Syzygium alternifolium* (KHAN, et al., 1998) e *Psidium guajava* (MISHRA, et al., 2007), a maior taxa de sobrevivência (70 e 80% respectivamente) foi obtida nos

tratamentos contendo misturas de substratos como solo com areia e fibra de côco.

Os substratos variam muito na sua composição e características. Uma mistura entre dois ou mais tende a ser ideal para o desenvolvimento das mudas, pois apresenta características diferentes específicas de cada um que, quando juntas, podem se complementar (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A vermiculita apresenta maior porosidade que permite maior escoamento da água, no entanto não possui nutrientes minerais. Por outro lado, o substrato florestal comercial (Plantmax) tem menor porosidade, retém mais água e pode fornecer, de certa forma, nutrientes minerais. Uma combinação entre os dois pode ser mais vantajosa como foi observado para a aclimatização de *Campomanesia xanthocarpa*.

Após a remoção da tampa da caixa ou do plástico PVC houve morte das mudas no decorrer do tempo. Possivelmente, o maior fator que dificultou a sobrevivência destas plantas foi a diferença da umidade relativa do ar entre o cultivo *in vitro* e a casa de vegetação. Uma das respostas a este estresse foi murchamento das folhas e não foram observadas formações de novas folhas adaptadas às condições *ex vitro*. Novas folhas desenvolvidas em condições *ex vitro* auxiliam no controle da perda de água através da transpiração e promovem aumento nas taxas de sobrevivência (POSPISILOVÁ *et al.*, 2007). A morte das mudas também pode estar relacionada com as regas que foram inadequadas logo depois da abertura da caixa.

Algumas plantas apresentaram sintomas de deficiência nutricional, como clorose internerval, ápice e bordo foliar queimados e necrose apical. Estes sintomas estão relacionados com a deficiência em nutrientes minerais que são de extrema importância para o desenvolvimento vegetal. Eles surgem devido a distúrbios metabólicos em resposta ao suprimento ineficiente de determinado nutriente considerado essencial para as plantas (TAIZ *et al.*, 2017). A necrose apical, seguida de perda da dominância apical já foi observada na micropropagação da batata e pode estar diretamente associada com a deficiência em cálcio ou boro (BUSSE *et al.*, 2008, (TAIZ *et al.*, 2017). Além

de provocar danos às regiões meristemáticas, a falta de cálcio pode acarretar no retardamento do crescimento vegetal, redução do tamanho e deformação foliar (AHMED e PALTA, 2017).

A clorose internerval observada em folhas jovens pode ser devida à deficiência em mangânes ou ferro, já a clorose seguida de necrose dos ápices e bordos foliares, pode estar relacionada tanto com a deficiência em potássio quanto em cloro (TAIZ *et al.*, 2017). Uma alternativa para solucionar este problema de nutrição mineral e promover a sobrevivência de plantas saudáveis é adicionar uma solução nutritiva diluída aos substratos.

De um modo geral, a aclimatização é conhecida como uma das etapas mais importantes e problemáticas da micropropagação, pois é nesta fase que as plantas micropropagadas devem se adaptar às novas condições *ex vitro* para conseqüentemente sobreviverem em campo (POPSILOVÁ *et al.*, 2007). Assim, os protocolos de micropropagação deveriam apresentar esta fase bem estruturada e detalhada afim de não deixar dúvidas e promover a replicabilidade dos experimentos. Todavia na bibliografia consultada para Myrtaceae, isto não ocorre e a aclimatização, na maioria das vezes, não é abordada ou é descrita superficialmente.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foram estabelecidas culturas assépticas de segmentos nodais de guabirobeira e o PPM™ foi eficaz para o controle das contaminações sem fitotoxidade. Todavia o efeito deste biocida na formação de novos brotos precisa ser estudado.

BAP foi a citocinina que promoveu maior taxa de multiplicação e novos brotos. Porém, a taxa de multiplicação mensal foi baixa durante os diferentes subcultivos e precisa ser melhorada.

Não foi necessária a realização da fase de alongamento dos brotos antes do enraizamento.

O AIB induziu maiores taxas de enraizamento dos explantes sem formação de calos na base.

A aclimatização foi a fase mais crítica, porém foram obtidas plantas normais e saudáveis sobreviventes após 60 dias cultivadas em uma mistura de substrato florestal Plantmax com vermiculita. Nesta etapa é recomendado o uso de uma pré-aclimatização para minimizar o estresse provocado pela diferença da umidade relativa do ar entre a casa de vegetação e a cultura *in vitro*, bem como a suplementação nutricional com soluções nutritivas adicionadas ao substrato para evitar deficiências nutricionais e promover maior taxa de sobrevivência de mudas saudáveis.

Futuros estudos são sugeridos para melhor compreender o desenvolvimento *in vitro* e obter maior quantidade de plantas aclimatizadas de *C. xanthocarpa*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA de SP. Cerrado: aproveitamento alimentar. **Planaltina: Embrapa-CPAC**. v.1, p. 188, 1998.

BATES, D; MAECHLER, M; BOLKER, B; WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, p. 1–48. 2015.

BLANDO, F; ONLU, S; COLELL, G; KONCKAK, I. Plant regeneration from immature seeds of *Eugenia mytifolia* Sims. In vitro cellular and developmental Biology Plant, n. 49, p. 388-395, 2013.

DEWIR Y. H.; SINGH, N.; MNGOMEZULU, S.; OMAR, A. M. K. Micropropagation and detection of important triterpenes in *in vitro* and field grown plants of *Syzygium cordatum*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 14, p. 3078-3083, 2011.

FERREIRA, I. C.; GUIMARÃES, A. G.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; FILHO, J. D. S.; GUIMARÃES, D. A. S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 100-108, 2013.

FREIRE, G.C; GARDIN, J.P.P; BARATTO, S.C; VIEIRA, R.L; WERNER, S.S. Micropropagation's complete protocol of red araçá (*Psidium cattleianum*, Myrtaceae) from germinated seeds *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n.2, p. 234-251, 2018.

FOX, J; WEISBERG, S. Functions and datasets to accompany. An R Companion to Applied Regression, Second Edition, **Thousand Oaks CA: Sage**. 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M A.; GEERT-JAN, K.; **Plant propagation by tissue culture**. 3ªed., v.1, The Background. 2008.

GEORGE, M.W; TRIPEPI, R.R. Plant Preservative Mixture™ can affect shoot regeneration from leaf explants of chrysanthemum, european birch and rhododendron. HortScience, v. 36, n.4, p. 768-769, 2001.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**. Santa Maria. n. 39, p. 1606-1613, 2009.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LÉON, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucra* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**. Santa Maria. n. 22, p. 207-214, 2012.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P.; HEIBERGER, R. M.; SCHUETZMEISTER, A.; SCHEIBE, S. Package multcomp: Simultaneous inference in General Parametric Models. R package version 3.2.5., p. 1-128, 2016. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/multcomp.pdf>. Acesso em: 21 de mar de 2017.

HUH, S.Y.; LEE, K.J.; KIM, I.J.; KANG, G.B.; LEE, K.Y. Effect of biocide addition on plantlet growth and contamination occurrence during the *in vitro* culture of blueberry. **Journal of Plant Biotechnology**. v. 42, p.111-116, 2015.

JALA, A.; CHANCHULA, N. Effect of BA and NAA on micropropagation of tea tree (*Melaleuca alternifolia* Cheel) In vitro. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 47, n.1, p. 37-43, 2014.

KHAN, V. S.; HAUSMAN, J. F.; RAO, K. R. Clonal multiplication of *Syzygium alternifolium* (Wight) Walp, through mature nodal segments. **Silvae Genética**, v.48, n.1, p.45-50, 1999.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society** v. 30, p. 421-427, 1980.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Camponesia adamantium* Camb.- Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MISHRA, M.; CHANDRA, R.; PATI, R.; BAJPAI, A. 2007. Micropropagation of guava (*Psidium guava* L.). **Acta Horticulturae**, v. 735, p. 155-158, 2007.

MIYAZAKI, J.; TAN, B.H.; ERRINGTON, S.G. Erradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrid* using Plant Preservative Mixture (PPM™). **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 365-372, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, C. L.; VARGAS, P. D.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaíra (*Eugenia pyriformis* Cambess.) efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde**, v.3, n. 2, p. 20-26, 2008.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B. Vegan: Community Ecology Package. R package version 3.2.5. Disponível em: <<http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>> Acesso em: 3 de Março de 2016.

OLIVEIRA, S. L.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439 – 453, 2013.

OLTRAMARI, A. C; DAL VESCO, L. L; PEDROTTI, E. L; DUCROQUET, J. H. H; NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000

PARRA L e AMO-MARCO J. B. Effect of plant growth regulators and basal media on *in vitro* shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. **Biologia Plantarum**. v. 38, n. 2, p. 161-168, 1996.

PAVAN, F. R; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PINHEIRO, J; BATES, D; DEBROY, S; SARKAR, D.and R-CoreTeam. Nlme: Linear and 745 Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.2.5., 1–128. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>> Acesso em: 16 de Ago de 2016.

POSPISILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HASEL, D.; SEMORÁDOVÁ, S. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂, concentration and abscisic acid (a review). **Acta Horticulturae**. v. 784 p. 29-38, 2007.

QUOIRIN, M; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.437-442, 1977.

ROSS, S.; GRASSO, R. *In vitro* propagation of ‘Guayabo del país’ (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret). **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**. v. 4, n. 1, p. 83-87, 2010.

ROSSATO, M; SCHUMACHER P. V; NETTO, A. P. C; SOUZA, G. C; REIS, E. F; STEIN, C. V. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* CAMB. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, n. 2, v. 11, p 70-77, 2015.

SCUTTI, M.B; ZANETTE, F. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**. V.1, n 12, p. 75-82, 2000.

SILVA, R. C. da; DEGENHARDT-GOLDBACH, J; QUOIRIN, M. Cultura *in vitro* de calos e quantificação de compostos fenólicos em gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg). **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Programa de pós-graduação em Botânica, Curitiba, Paraná, 2016.

SILVA, P. R. D. da.; RISPOLI, R. G.; MINOZZO, M. M.; JOBIM, L. H.; JUNGES, M.; STEFENON, V. M. A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and micropropagation. **Annals of Forest Research**. v. 57, n. 1, p. 39-45, 2014.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 29 Jun. 2016.

VIECELI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECELI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**. n. 234, p. 85-92, 2014.

VINAGRE, A. S.; RONNAU, A. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U.; WIILLAND, E. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 5, p. 870-874, 1980.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E FLUORESCÊNCIA DA
CLOROFILA A EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE GUABIROBEIRA
(*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg – MYRTACEAE)

CURITIBA

2018

RESUMO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae) popularmente conhecida como guabiroba, é uma árvore frutífera do Cerrado e da Mata Atlântica. Possui dificuldades de propagação e a micropropagação é uma alternativa para superar este problema. Plantas aclimatizadas e cultivadas *in vitro* geralmente apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas em relação a plantas cultivadas *ex vitro*. O objetivo deste trabalho foi comparar o teor de pigmentos fotossintéticos e a fluorescência da clorofila *a* em plantas micropropagadas de guabirobeira após 60 dias de aclimatização em relação a plantas germinadas e cultivadas *in vitro*, bem como, *ex vitro*. Para isso, pigmentos foram extraídos a partir discos foliares de um centímetro de diâmetro coletados de plantas nestas três condições e analisados por meio de espectrofotometria. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram analisados com o auxílio de um fluorômetro em folhas previamente adaptadas ao escuro de plantas cultivadas em cada condição. Plantas cultivadas *in vitro* apresentaram valores inferiores de teor de pigmentos e menor razão entre as clorofilas *a* e *b* em relação às plantas cultivadas *ex vitro* e aclimatizadas. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* corroboraram os resultados obtidos dos pigmentos e todos foram menores nas plantas *in vitro*. Não houve diferença no teor de pigmentos e parâmetros da fluorescência entre as plantas cultivadas *ex vitro* e aclimatizadas. Portanto, as condições de aclimatização das mudas de guabirobeira foram adequadas e estas plantas apresentaram potencial fotossintético semelhante a de plantas não micropropagadas cultivadas *ex vitro*. Por outro lado, plantas cultivadas *in vitro* possuem baixo potencial fotossintético possivelmente devido à presença de sacarose nos meios de cultura.

Palavras-chave: Aclimatização, carotenoides, fotossíntese, micropropagação.

ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), popularly known as guabiroba, is a fruit tree native to the Savanna and Atlantic Forest of Brazil. There are some problems of propagation for this tree and micropropagation is an alternative to overcome this problem. Micropropagated and *in vitro* plants generally exhibit anatomical and physiological differences in relation to plants grown under *ex vitro* conditions. The objective of this study was to compare the content of photosynthetic pigments and chlorophyll *a* fluorescence in guabirobeira acclimatized plants in comparison with *in vitro* and *ex vitro* cultivated plants. For this, pigments were extracted from one-centimeter diameter leaf disks collected from plants in these three conditions and analyzed by spectrometry. Parameters of chlorophyll *a* fluorescence were analyzed with a fluorometer on leaves of plants grown in each condition previously adapted to the dark. Plants cultivated *in vitro* presented lower values of pigment content and lower ratio between chlorophyll *a* and *b* when compared with *ex vitro* and acclimatized plants. The chlorophyll fluorescence parameters were in agreement with the results obtained for the pigment content and all were lower in *in vitro* plants. There was no difference in pigment content and fluorescence parameters between *ex vitro* and acclimatized plants. In conclusion, the acclimatization of the guabirobeira seedlings was efficient and these plants presented photosynthetic potential similar to non-micropropagated plants cultivated *ex vitro*. However, plants grown *in vitro* were under stress and had a low photosynthetic potential.

Keywords: Acclimatization, carotenoids, micropropagation, photosynthesis.

1. INTRODUÇÃO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg é uma espécie nativa do Brasil pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como guabiroba e com ocorrência no Cerrado e Mata Atlântica (SOBRAL *et al.*, 2016). Essa espécie apresenta princípios medicinais utilizados na cultura popular e desperta crescente interesse em pesquisas para o combate do diabetes (VINAGRE *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; VIECELI *et al.*, 2014). Além do interesse medicinal, a guabirobeira é utilizada como fonte de madeira para lenha e para consumo *in natura*, produção de geleias, sucos, doces e licores a partir dos seus frutos que possuem sabor adocicado (ALMEIDA, 1998).

Plantas micropropagadas geralmente apresentam características anatômicas e fisiológicas diferentes de plantas da mesma espécie que não passaram pelo processo de micropropagação (POSPISILOVÁ *et al.*, 1999). Bolar *et al.* (1998) ressaltaram que as plantas transplantadas necessitam de ambientes sombreados e mais úmidos para evitar a dessecação e a fotoinibição. As taxas fotossintéticas e a pigmentação (teores de clorofilas e demais pigmentos) podem ser diferentes em plantas aclimatizadas e em plantas cultivadas em campo (POSPISILOVÁ *et al.*, 2007).

A análise da fluorescência da clorofila *a* é uma importante ferramenta utilizada na avaliação da eficiência da fotossíntese das plantas e em estudos sobre o efeito de diferentes condições de crescimento no processo fotossintético (KALAJI *et al.*, 2012). Dentre os vários parâmetros analisados, o equilíbrio entre a utilização da energia fotoquímica e a dissipação de energia não fotoquímica (emissão de calor e fluorescência) revelam fatores determinantes no crescimento das plantas (TURAN *et al.*, 2014).

Avaliar os teores de pigmentos fotossintéticos e a fluorescência da clorofila *a* na guabirobeira, pode fornecer informações importantes sobre a fotossíntese destas plantas e indicar como o potencial fotossintético pode ser afetado e variar de acordo com o processo de micropropagação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar o potencial fotossintético das plantas micropropagadas aclimatizadas e de plantas crescidas tanto *in vitro* como *ex vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os teores de pigmentos fotossintéticos das plantas submetidas às diferentes condições de cultivo;
- Comparar a emissão de fluorescência por meio da cinética lenta e rápida de plantas cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e aclimatizadas;
- Associar a bioquímica da cinética de emissão de fluorescência com a disponibilidade de luz nas diferentes condições de cultivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas folhas de guabirobeira obtidas a partir das plantas descritas a seguir:

1. Plantas com sete meses de idade, obtidas de sementes germinadas *in vitro* e cultivadas em meio de cultura WPM, com 0,1% de PPM e 3% de sacarose, mantidas em sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h e temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$;

2. Plantas *ex vitro* com sete meses de idade, obtidas de sementes germinadas e cultivadas em casa de vegetação, que não foram submetidas a técnicas de micropropagação, com PPFD de $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h e temperatura de $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
3. Plantas micropropagadas e aclimatizadas (60 dias) em casa de vegetação, sob condições controladas e PPFD de $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h e temperatura de $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

As plantas de tipo 3 foram obtidas através dos experimentos de micropropagação a partir de segmentos nodais, desenvolvidos anteriormente no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica da UFPR.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Para estimar os teores de clorofilas e carotenoides, foram utilizados discos foliares contendo um centímetro de diâmetro e obtidos do segundo par de folhas mais jovens das plantas descritas no item 3.2. Estes discos foram pesados para obtenção da massa fresca e submetidos à metodologia de extração de pigmentos descrita por Lichtenthaler e Webburn (1983).

Em uma sala com baixa intensidade luminosa, cada disco foi colocado em graal com aproximadamente 0,02 mg de CaCO_3 e adicionado de 8 mL de acetona 80% gradualmente mediante a maceração do tecido vegetal. Após este procedimento, o extrato obtido foi colocado em tubos Falcon e centrifugado em 4000 rpm durante 15 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para as leituras da absorbância que foram realizadas no espectrofotômetro *Biosystems* nos comprimentos de onda de 470, 646 e 663 nm. Para realizar os cálculos dos teores de pigmentos, foram utilizadas as fórmulas propostas por Lichtenthaler e Webburn (1983) modificadas por Porra *et al.*, (1989):

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 12,25 (A_{663,6}) - 2,55 (A_{646,6})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 20,31 (A_{646,6}) - 4,91 (A_{663,6})$$

$$\text{Clorofila total (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 17,76 (A_{646,6}) + 7,34 (A_{663,6})$$

$$\text{Carotenóides (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (1000 A_{470} - 3,27 [\text{chl } a] - 104 [\text{chl } b])/227$$

3.3 ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

As folhas das plantas analisadas foram previamente adaptadas ao escuro durante 10 minutos para permitir o equilíbrio do transporte de elétrons nos fotossistemas I e II. Foi analisada uma folha completamente expandida no segundo par de folhas mais jovens de cada planta. A análise da cinética rápida da fluorescência da clorofila e dos parâmetros foi realizada com o fluorômetro portátil de amplitude modulada PAM 2500 (Heinz Walz, GmbH).

Os parâmetros analisados foram a fluorescência inicial (F_0) e máxima (F_m). Também foram calculados os valores de: fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$), F_v/F_m (rendimento quântico máximo do fotossistema dois) e F_v/F_0 (atividade potencial do fotossistema dois)

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

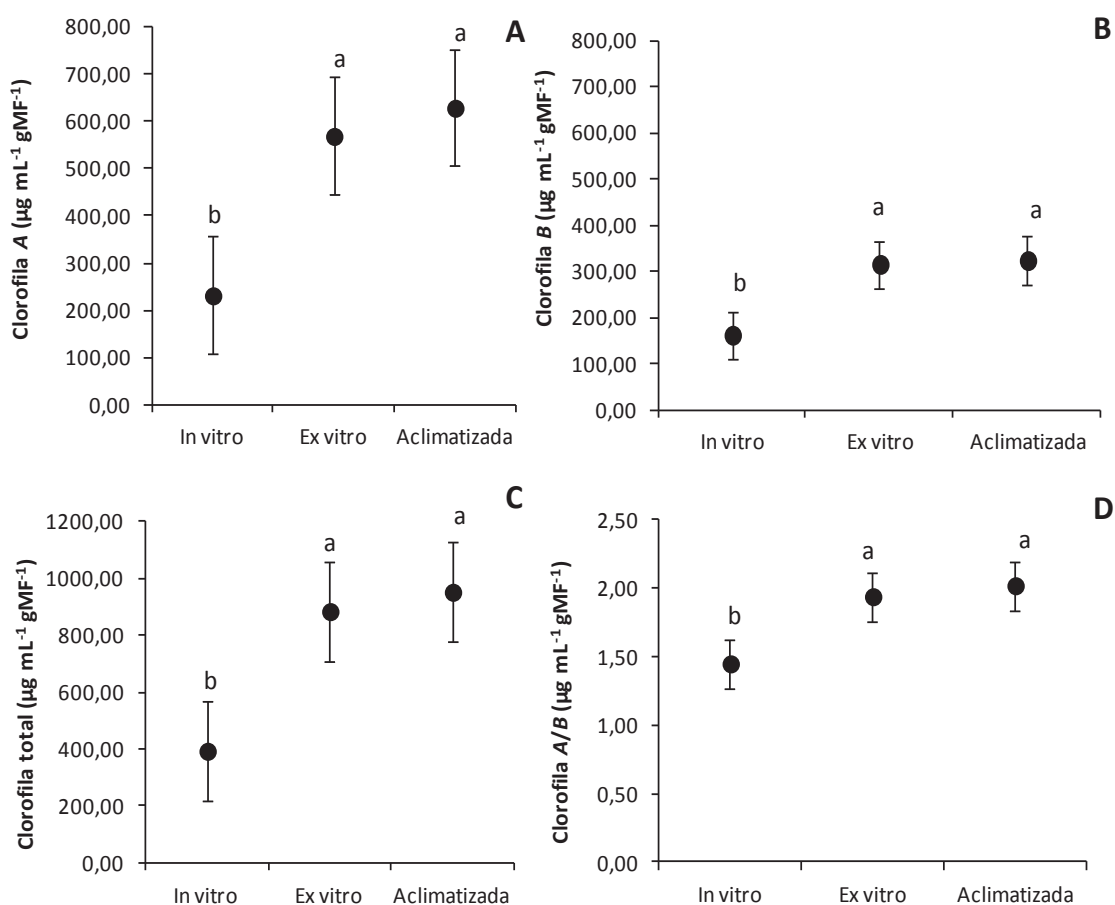
As análises foram realizadas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições por tratamento, sendo uma planta considerada uma repetição. Os resultados foram submetidos a análise da variância ANOVA e ao teste de Tukey com 0,01% de probabilidade de erro.

4. RESULTADOS

4.1 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Não houve diferença entre os teores de clorofilas (*a*, *b* e total) das plantas cultivadas *ex vitro* e aclimatizadas. Porém, essas concentrações diferiram e foram superiores em relação às cultivadas *in vitro* (FIGURA 20 A-C). Nas plantas cultivadas *in vitro*, a razão clorofila *a/b* foi menor em relação às plantas cultivadas em condições *ex vitro* (FIGURA 20D).

FIGURA 20 - TEOR DE CLOROFILAS EM DISCOS FOLIARES DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADOS *IN VITRO*, *EX VITRO* E EM PLANTAS ACLIMATIZADAS APÓS 60 DIAS

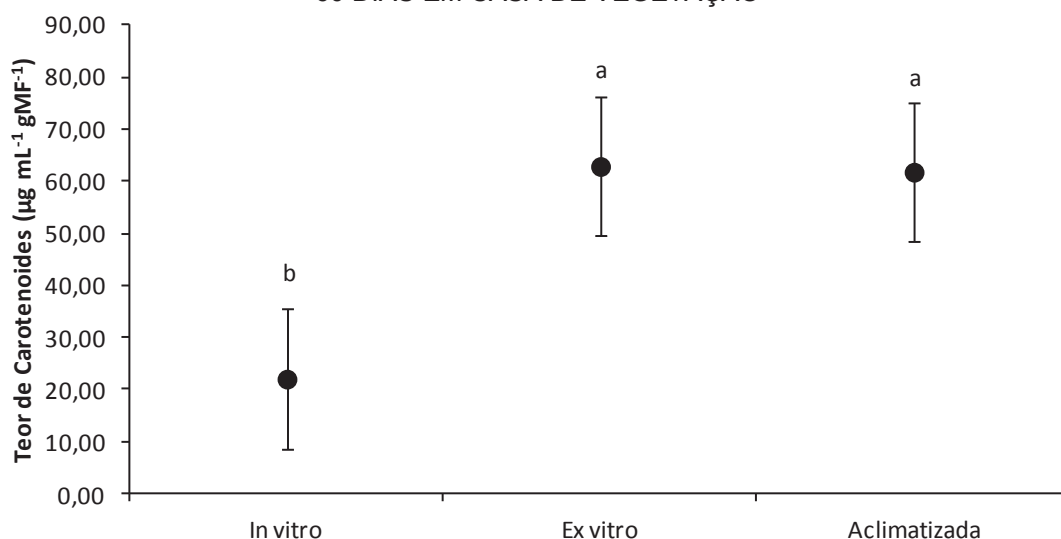


A: CLOROFILA A; B: CLOROFILA B; C: CLOROFILA TOTAL; D: CLOROFILA A/B. DADOS COM LETRAS IGUAIS ACIMA DOS VALORES, NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO.

FONTE: O Autor (2018).

Todas as plantas analisadas apresentaram teor de carotenoides menor em relação às clorofilas. Da mesma forma, houve diferença apenas em relação às plantas cultivadas *in vitro* que apresentaram teor menor que as cultivadas em condições *ex vitro* (FIGURA 21).

FIGURA 21: TEOR DE CAROTENOIDES EM DISCOS FOLIARES DE PLANTAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS *IN VITRO*, *EX VITRO* E ACLIMATIZADAS APÓS 60 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

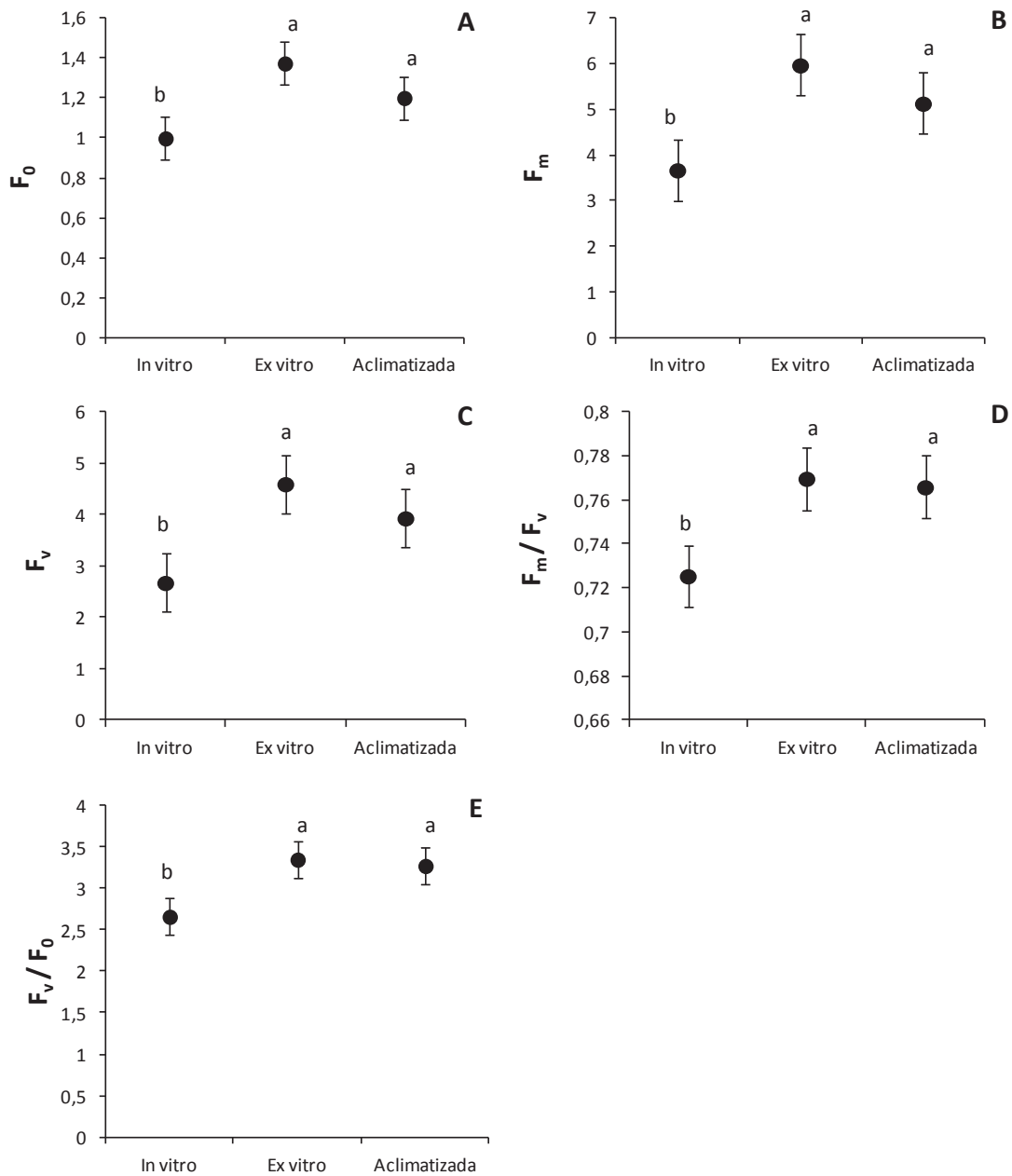


DADOS COM LETRAS IGUAIS ACIMA DOS VALORES NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

4.2 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

As plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram F_0 maior em relação às plantas micropropagadas e às cultivadas *in vitro*. Nos demais parâmetros, os dados assemelham-se com os resultados dos teores de pigmentos fotossintéticos onde os valores obtidos nas plantas cultivadas *ex vitro* e nas micropropagadas aclimatizadas são maiores e diferem das plantas *in vitro* (FIGURA 22). A fluorescência variável (F_v) é um reflexo do estado de oxidação da quinona A (Q_A).

FIGURA 22: PARÂMETROS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A EM PLANTAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS *IN VITRO*; *EX VITRO* E ACLIMATIZADAS APÓS 60 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

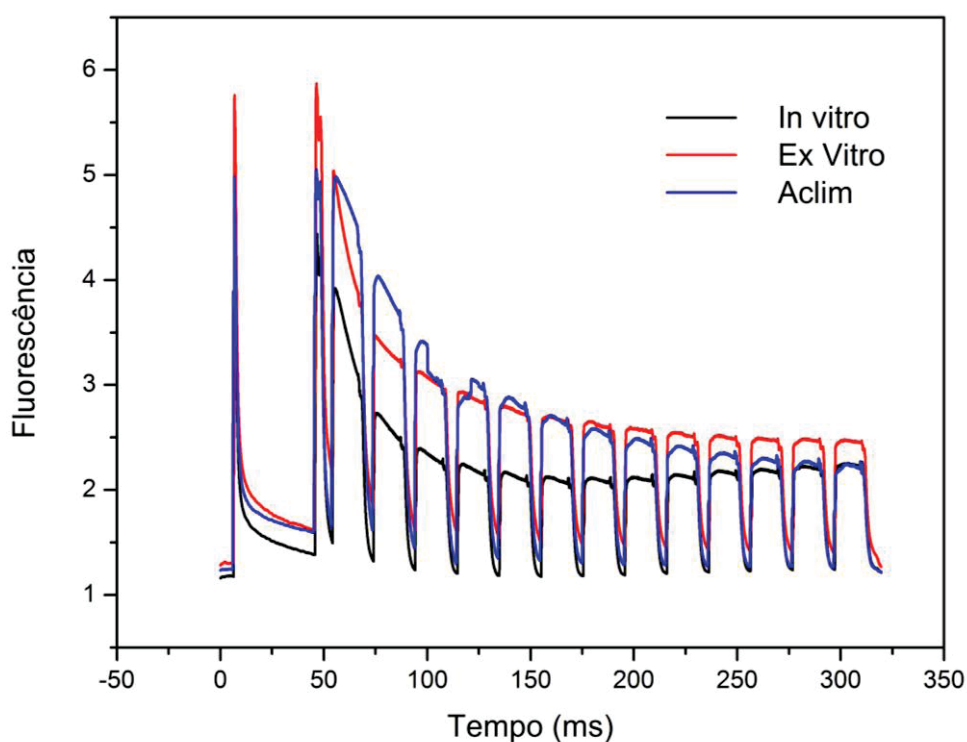


A: F_0 : FLUORESCÊNCIA INICIAL; B: F_m : FLUORESCÊNCIA MÁXIMA; C: F_v : DIFERENÇA ENTRE FLUORESCÊNCIA INICIAL E MÁXIMA; D: F_v/F_m : RENDIMENTO QUÂNTICO DO FOTOSSISTEMA II; E: F_v/F_0 : ATIVIDADE POTENCIAL DO FOTOSSISTEMA II. DADOS COM A MESMA LETRA ACIMA DOS VALORES NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

A emissão de fluorescência modulada por indução de sucessivos pulsos de luz saturante permite avaliar a dissipação de energia não fotoquímica. A resposta das plantas *ex vitro* e aclimatizadas foram semelhantes e apresentaram valores mais elevados de F'_m quando comparadas às plantas *in vitro* (FIGURA 23).

De maneira similar aos resultados observados em outros aspectos fisiológicos das plantas de *C. xanthocarpa* cultivadas sob diferentes condições, as plantas cultivadas *ex vitro* e aclimatizadas apresentaram curva de indução lenta muito semelhantes. As plantas cultivadas *in vitro* e mantidas sob luminosidade mais elevada apresentaram níveis bem mais baixos de emissão de fluorescência.

FIGURA 23: DISSIPAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A POR INDUÇÃO DA CINÉTICA LENTA EM PLANTAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS *IN VITRO*; *EX VITRO* E ACLIMATIZADAS APÓS 60 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

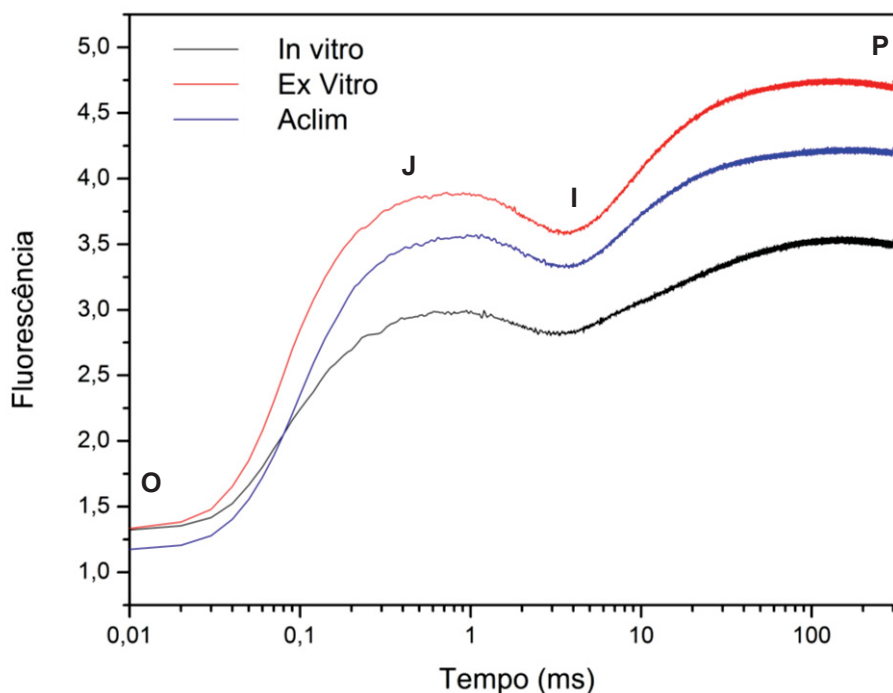


FONTE: O Autor (2018).

Os diferentes alcances dos picos de fluorescência máxima após pulso de luz saturante (F_m') revelam diferentes condições dos estados de oxidação e redução da cadeia de transporte de elétrons. Este parâmetro comparado à F_m (primeiro pico de luz saturante observado após a adaptação ao escuro) demonstra o maior rendimento fotossintético do fotossistema II das plantas cultivadas *ex vitro*, conforme já demonstrado na figura 22D.

A curva típica OJIP da fluorescência transitória, observada em plantas de *C. xanthocarpa*, também revelou menor emissão de fluorescência nas plantas *in vitro*, quando comparadas às plantas aclimatizadas (FIGURA 24). As plantas *ex vitro*, mantidas sob luminosidade mais baixa apresentaram a curva mais elevada em comparação aos demais tratamentos. O alcance da fluorescência no ponto P (F_m) revela que as plantas *ex vitro* apresentam maior capacidade de redução da quinona A (Q_A).

FIGURA 24: CURVA DE FLUORESCÊNCIA TRANSITÓRIA (OJIP) EM PLANTAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADAS *IN VITRO*; *EX VITRO* E ACLIMATIZADAS APÓS 60 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.



FONTE: O Autor (2018).

5. DISCUSSÃO

5.1 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Os teores de pigmentos fotossintéticos (Clorofilas *a*, *b*, totais e carotenoides) foram maiores nas plantas cultivadas em condições *ex vitro* em relação às cultivadas *in vitro*. Isto indica que possivelmente houve aumento destes teores nas plantas micropropagadas após a aclimatização *ex vitro*. Os teores de pigmentos dependem de diversos fatores e, entre eles, a luminosidade, a presença ou ausência de sacarose nos meios de cultura *in vitro* e a concentração de CO₂ no ar são os mais importantes (POSPISILOVÁ, *et al.*, 2007).

O aumento nos teores de pigmentos após a transferência das plantas para condições *ex vitro* como observado em *C. xanthocarpa* também ocorreu em outras espécies micropropagadas como em *Calanthea lousiae* após vinte e um dias de aclimatização (HUYLENBROECK *et al.*, 2000), em *Rauvolfia tetraphylla* após trinta dias (FAISAL e ANIS, 2009) e *Nicotiana tabacum* após trinta e cinco dias (KADLECEK *et al.*, 2001). Diferentemente, em *Cattleya xanthina* (LANDO *et al.*, 2016) e no abacate (PREMKUMAR *et al.*, 2001), os teores de pigmentos não aumentaram e os maiores valores foram obtidos nas plantas cultivadas *in vitro*.

A baixa concentração destes pigmentos no cultivo *in vitro* pode ser explicada pela presença de sacarose nos meios de cultura. A sacarose é um dos produtos da fotossíntese e, quando fornecida de forma exógena, contribui para que a planta não precise realizar a transformação de energia luminosa em química (cultivo heterotrófico) (POSPISILOVÁ *et al.*, 1999).

Outro fator importante para a realização da fotossíntese é a quantidade de luz ou densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) fornecida para as plantas. Geralmente, no cultivo *in vitro*, as plantas estão expostas a baixas intensidades luminosas enquanto que, na fase de aclimatização *ex vitro*, a luminosidade é maior (FAISAL e ANIS, 2009). Assim, a diferença de PPFD

entre os cultivos é um fator que contribui para a dificuldade da aclimatização e sobrevivência das plantas micropropagadas (POSPISILOVÁ, 1999).

Na aclimatização de *Campomanesia xanthocarpa*, a PPFD medida na casa de vegetação era menor que na sala de crescimento *in vitro* e, nestas condições, os teores de pigmentos foram maiores. Este fato pode estar relacionado com a adaptação das mudas às novas condições de cultivo sem a suplementação do meio de cultura com sacarose e intensidade menor de luminosidade. De acordo com Pospisilová *et al.*, (2009), algumas semanas de crescimento das plantas sob condições sombreadas e com aumento gradual da intensidade luminosa é um pré-requisito para o sucesso e estabelecimento de plantas vigorosas. Outro processo importante durante esta fase é o aumento da síntese de enzimas responsáveis para a biossíntese das clorofilas que consequentemente aumentam o teor destes pigmentos nas plantas aclimatizadas em condições *ex vitro* (FAISAL e ANIS, 2009).

O sombreamento pode provocar o aumento dos teores de pigmentos devido ao efeito compensatório por parte das plantas para a melhor captação de luz. Porém, em plantas expostas a longos períodos sob condições sombreadas, a razão clorofila *a/b* tende a diminuir devido a degradação da clorofila *a* ser mais rápida que a da clorofila *b* (LEE, 2010).

Por outro lado, condições com alta PPFD podem causar degradação dos pigmentos e danos ao PSII que consequentemente causam fotoinibição nas plantas expostas a estas condições (POSPISILOVÁ *et al.*, 2007). Em *Rauvolfia tetraphylla* e *Castanea sativa* x *Castanea crenata*, houve fotoinibição em 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (FAISAL e ANIS, 2009, CARVALHO *et al.*, 2001). Em *Quercus ruber*, intensidades de 200-600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ causaram diminuição da fotossíntese (PREMKUMAR *et al.*, 2001). Em *Cattleya xanthina*, houve redução das clorofilas nas plantas cultivadas em 150-200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (LANDO *et al.*, 2016).

Devido aos efeitos de fotoinibição, condições com menor PPFD podem ser mais adequadas para o cultivo *in vitro* e condições fotoautotróficas têm sido investigadas para promover um aumento na obtenção de plantas com redução

de estresse durante a fase de aclimatização bem como o fim do uso de sacarose nos meios de cultura (XIAO *et al.*, 2010).

Atualmente, não existem estudos sobre a fotossíntese em *C. xanthocarpa* e isto dificulta comparações com os resultados obtidos. Porém, alguns trabalhos com espécies próximas indicam que o cultivo em condições sombreadas é mais adequado para estas espécies. Em *Eugenia uniflora*, as taxas de crescimento inicial e teores de pigmentos fotossintéticos foram maiores no sombreamento do que em pleno sol (MARTINAZZO *et al.*, 2007, MIELKE e SCHAFFER, 2010). Além disso, altos valores de PPFD associados com a estação seca no Cerrado causaram fotoinibição em *Eugenia dysenteria* e *Campomanesia adamantium* (LEMOS-FILHO, 2000).

As plantas de guabirobeira obtidas a partir da germinação de sementes *ex vitro*, mantidas sob menor PPFD, apresentaram as maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos. Considerando a influência da luminosidade, podemos inferir que, assim como em *Eugenia uniflora*, as baixas condições de luz favorecem o desenvolvimento desta espécie e que as plantas aclimatizadas possuem potencial fotossintético semelhante ao das plantas obtidas por germinação. Portanto, podemos afirmar que a aclimatização destas plantas foi eficiente em termos fotossintéticos.

5.2 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

Em relação aos parâmetros de fluorescência, os dados obtidos mostraram-se semelhantes aos resultados dos teores de pigmentos e confirmam que as plantas cultivadas *in vitro* apresentam menor potencial fotossintético em relação às plantas cultivadas *ex vitro* e aclimatizadas.

O parâmetro F_v/F_m indica o índice de vitalidade através da integridade e do funcionamento do PSII. F_0 indica o tamanho do complexo antena, ou seja, a quantidade de pigmentos presentes no PSII e a sua queda pode ser devida à baixa concentração destes pigmentos (DEELL *et al.*, 2003).

Os valores obtidos em *C. xanthocarpa* para a relação F_v/F_m foram maiores nas plantas crescidas *ex vitro* (0,77 e 0,76) em relação às *in vitro* (0,72). Em plantas saudáveis, os valores de F_v/F_m variam entre 0,75 e 0,85 e valores diferentes destes indicam que a planta está sob algum tipo de estresse e, conseqüentemente, a captação da energia luminosa é pouco eficiente e há uma maior perda por fluorescência (DEEEL *et al.*, 2003).

Isto nos indica que as plantas cultivadas *in vitro* mostram baixo potencial fotossintético, pois estas condições podem ser estressantes. No entanto, devemos considerar que no meio de cultura destas plantas existe sacarose. A sacarose é um produto final da fotossíntese e, quando fornecida de forma exógena, permite que a planta a absorva de forma direta e não necessite despendiar energia para a realização do processo fotossintético.

A indução da cinética lenta por ocasião do primeiro pulso saturante, fecha todos os centros de reação e permite considerar apenas a dissipação de energia não fotoquímica (emissão de calor e fluorescência), em função das plantas se encontrarem com todos os fotossistemas abertos (BAKER e ROSENQVIST, 2004).

As diferentes fases da curva transitória da fluorescência (curva OJIP) estão relacionadas aos diferentes passos da cadeia de transporte de elétrons que ocorre durante o processo fotossintético. As fases O-J e J-I representam a redução do *pool* de plastoquinonas ($Q_A + Q_B$) do lado aceptor do fotossistema II, enquanto a fase I-P está relacionada aos aceptores de elétrons localizados ao redor do fotossistema I (KALAJI *et al.*, 2014). As plantas de *C. xanthocarpa* cultivadas sob menor intensidade de PPFD revelaram menor *pool* de quinonas reduzidas, bem como menor número de aceptores do fotossistema I.

6. CONCLUSÃO

Plantas de guabirobeira cultivadas *ex vitro* possuem maior teor de pigmentos fotossintéticos em relação as plantas cultivadas *in vitro*. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* corroboram os dados observados de teor de pigmentos e indicam que as plantas *in vitro* apresentam menor rendimento quântico do PSII e redução do potencial fotossintético possivelmente devido a presença de sacarose nos meios de cultura.

A aclimatização de plantas micropropagadas em condições com baixo PPFD mostrou-se adequada para o desenvolvimento das plantas com maior teor de pigmentos e rendimento quântico do PSII.

Entre os fatores que mais afetam o desempenho da fotossíntese nestas plantas estão o maior PPFD e a possivelmente a presença de sacarose nos meios de cultura *in vitro*.

Desta forma, recomendamos a aclimatização das mudas micropropagadas de guabirobeira sob condições mais baixas de PPFD e a possível remoção da sacarose no meio de cultura das plantas cultivadas *in vitro* a partir de sementes.

Futuras pesquisas com a análise da fotossíntese através do teor de pigmentos, fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas durante as etapas da micropropagação, na aclimatização assim como em indivíduos adultos podem auxiliar a melhor compreensão deste processo na guabirobeira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA de SP. Cerrado: aproveitamento alimentar. **Planaltina: Embrapa-CPAC**. v.1, p. 188, 1998.

BAKER, R. N. ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 403, p. 1607 – 1621, 2014.

BOLAR, J. P; NORELLI, J. L; ALDWINCKLE, H. S; HANKE, V. An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. **Horticulturae Science**, n, 37, p. 1251–1252, 1998.

CARVALHO, C. L; OSÓRIO, M. L; CHAVES, M. M; AMÂNCIO, S. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chesnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 67, p. 271-280, 2001.

CUENCA, B. SANCHÉZ, C; ALDREY, A; BOGO, B; BLANCO, B; CORREA, B; VIDAL, N. Micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*) in liquid medium in a continuous immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 131, p. 307-320, 2017.

DEELL, J. R; TOLVONEN, P. M. A. Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology. Kluwer Academic Publishers, p. 79-115, 2003.

FAISAL, M e ANIS, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 99, p. 125-132, 2009.

FERREIRA, I. C.; GUIMARÃES, A. G.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; FILHO, J. D. S.; GUIMARÃES, D. A. S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 100-108, 2013.

HUYLENBROECK, J M. VAN; PIQUERAS, A; DEBERGH, P. C. The evolution of photosynthetic capacity and antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. **Plant Science**, n. 155, p. 59-66, 2000.

KADLECEK, P; TICHÁ, I; HASEL, D; CAPKOVÁ, V; SCHAFER C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, n. 161, p. 695 – 701, 2001.

KALAJI, H. M; CARPENTIER, R; ALLAKHVERDIEV, S. I; BOSA, K. 2012. Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 112, p. 1–6, 2012.

KALAJI, H. M; SCHANSKER, G; LADLE, J. R; GOLTSEV, V; BOSA, K; ALLAKHVERDIEV, S. I; BUSSOTTI, M. B. F; CALATAYUD, A; BROWSKI, P. D; ELSHEERY, N. I; FERRONI, F; GUIDI, L; HOGEWONING, S. W; JAJOO, A; MISRA, A. N; NEBAUER, S. G; PANCALDI, S; PENELLA, C; POLI, D; POLLASTRINI, M; ROMANOWSKA-DUDA, Z, B; RUTKOWSKA, B; SERÔDIO, J; SURESH, K; SZULC, W; TAMBUSSI, E; YANNICCARI, M; ZIVCAK, M. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis research**, n. 122, v. 2, p.121-158, 2014.

LANDO, A. P; WOLFART, M. R; FERMINO, P. C. P; SANTOS, M. Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. **Biologia Plantarum**, n. 60, v. 2, p. 219-225, 2016.

LEE, D. W; OBERBAUER, S. F; JHONSON, P; KRISHNAPILAY, B; MANSOR, M; MONHAMED, H; YAP, K. S. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American journal of botany**, n. 87, v. 4, p. 447-455, 2000.

LEMOS-FILHO, J. Fotoinibição em três espécies do Cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenteria* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 1, v.1, p. 45-50, 2000.

LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARTINAZZO, G. E; ANISE, S; WANDSCHEER, A. L. D; PASTORINI, P. H. Efeito do sobreamento sobre o crescimento inicial e teor de clorofila de *Eugenia uniflora* Lin. (Pitanga), Família Myrtaceae. **Revista brasileira de biociências**, n. 5, v. 2, p. 167-164, 2007.

MAXWELL, K.; JOHNSON, N. G. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Camponesia adamantium* Camb.- Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MIELKE, S. M; SCHAFFER, B. Photosynthetic and growth responses of *Eugenia uniflora* seedlings to soil flooding and light intensity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 2, p. 113-121, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384-394, 1989.

POSPISILOVÁ, J.; TICHÁ, I. KADLECEK, P.; HASEL, D. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**. v. 42, V. 4, p. 481-497, 1999.

POSPISILOVÁ, J.; SINKOVÁ, H.; HASEL, D.; SEMORADOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂, concentration and abscisic acid: A review . **Biologia Plantarum**. v. 42, p. 481-497, 2007.

POSPISILOVÁ, J.; SINKOVÁ, H.; HASEL, D.; BATKOVÁ, P. Effects of abscisic acid on photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco. **Biologia Plantarum**. n. 53, v.1, p. 11-20, 2009.

PREMKUMAR, A.; MERCADO, J.A.; QUESADA, M. A. Effects of in vitro tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. **Journal of Plant Physiology**, n. 158, p. 835-840, 2001.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 29 Jun. 2016

TURAN, S.; KUMAR, S.; CORNISH, K. Photosynthetic response of in vitro guayule plants in low and high lights and the role of non-photochemical quenching in plant acclimation. **Industrial Crops and Products**, n. 54, p. 266-271, 2014.

VIECELI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECELI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**. n. 234, p. 85-92, 2014.

VINAGRE, A. S.; RONNAU, A. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U.; WIILLAND, E. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 5, p. 870-874, 1980.

XIAO, Y. NIU, G; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 105, p. 149-158, 2011.

CAPÍTULO 3

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg - MYRTACEAE)

CURITIBA

2017

RESUMO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), popularmente conhecida como guabiroba, é uma espécie nativa do Cerrado e da Mata Atlântica. Ela possui potencial econômico como frutífera e medicinal. Suas sementes são recalcitrantes e isto dificulta a propagação por métodos tradicionais. A embriogênese somática pode ser utilizada para superar este problema e promover a propagação massal de plantas. Discos foliares, obtidos de plantas cultivadas *in vitro*, e embriões zigóticos maduros foram testados para a indução de embriões somáticos. Os explantes foram inoculados em meios de cultura MS e WPM, suplementados com 2,4-D ou Picloram (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 μM) juntamente com 3,42 mM de glutamina. As culturas foram mantidas no escuro. O meio que promoveu maior indução de calos foi o WPM suplementado com 2,4-D. Os discos foliares apresentaram apenas calogênese e esta foi lenta (30 a 60 dias) em relação aos embriões zigóticos que apresentaram formação de massas embriogênicas em uma semana. A formação de embriões somáticos (8%) foi registrada em massas embriogênicas após 180 dias em meio WPM na presença de 7,5 μM de 2,4-D, enquanto não houve formação nas demais concentrações. Porém, 50% dos embriões somáticos eram anormais, com cotilédones fusionados e/ou ausência de sistema radicial. Os embriões somáticos em diferentes estádios foram todos convertidos em plantas quando transferidos para meio WPM sem reguladores e na presença de luz. Esse estudo permitiu a obtenção de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros com conversão em plantas normais. Futuros estudos destinados a aumentar a taxa de formação de embriões somáticos normais são recomendados.

Palavras-chave: Árvore frutífera, 2,4-D, gabioba, meio WPM, picloram.

ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa O. Berg (Myrtaceae), popularly known as guabiroba, is a species native to the Cerrado and Atlantic Forest of Brazil. This species has economic potential as a fruit tree and medicinal plant but its seeds are recalcitrant and this hinders the propagation by traditional methods. Somatic embryogenesis can be used to promote propagation on a large scale. For callus induction, two types of explants were used: one-centimeter leaf discs obtained from *in vitro* cultured plants and mature zygotic embryos that were disinfested and inoculated in culture media. MS and WPM media, supplemented with different concentrations of 2,4-D or Picloram and 3,42 mM glutamine, were tested. The cultures were maintained in the dark. The medium that promoted the greatest callus induction was WPM supplemented with 2,4-D. Leaf discs presented only callogenesis and this was slower than for the zygotic embryos that formed callus in one week. Somatic embryos developed from 8% of embryogenic calluses when cultured in a medium containing 7.5 μ M 2,4-D. The somatic embryos obtained were at different stages of development and all were converted into seedlings when transferred to WPM medium without regulators and in the presence of light. However, 50% of them were abnormal with fused cotyledons and some of them without root system. Through this study it was possible to obtain somatic embryos from zygotic embryos, that were converted into normal plantlets. Future studies to improve the somatic embryos formation rate are widely encouraged.

Key-words: 2,4-D, fruit tree, guabiroba, picloram, WPM medium.

1. INTRODUÇÃO

Campomanesia xanthocarpa O. Berg é uma espécie lenhosa, nativa do Brasil, pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como guabirobeira, com ocorrência no Cerrado e na Mata Atlântica (SOBRAL *et al.*, 2016). Essa espécie apresenta princípios medicinais amplamente utilizados na cultura popular e com um crescente interesse em pesquisas para o combate do diabetes (VINAGRE *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; VIECELI *et al.*, 2014).

Além do interesse medicinal, a guabirobeira é utilizada por moradores locais como fonte de lenha e de frutos para consumo *in natura* além de produção de geléias, sucos, doces e licores (ALMEIDA, 1998). As sementes de guabirobeira são classificadas como recalcitrantes e não sobrevivem muito tempo após serem retiradas dos frutos. Este fato impossibilita seu armazenamento e dificulta seu plantio, consequentemente torna-se um obstáculo para a sua propagação (MELCHIOR *et al.*, 2006).

Além da dificuldade de propagação gamética, estudos preliminares mostraram a dificuldade da propagação vegetativa da guabirobeira por meio de técnicas de propagação vegetativa. Dentre os problemas encontrados, destaca-se a falta de enraizamento das estacas, bem como altas taxas de oxidação, elevada morte dos explantes, contaminação microbiana e baixa percentagem de enraizamento na micropropagação por multiplicação de gemas axilares (SCUTTI e ZANETTE, 2000).

Embriogênese somática é a capacidade de uma célula vegetal somática se desdiferenciar e diferenciar-se novamente em um embrião somático, com características semelhantes às de um embrião zigótico. Este processo pode ocorrer teoricamente em todas as espécies de plantas quando cultivadas em condições favoráveis e ser reproduzido *in vitro* para a propagação massal de plantas (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

Considerando as limitações da propagação de *C. xanthocarpa* por sementes e por macropropagação, a obtenção de um protocolo de micropropagação por embriogênese somática é importante para poder multiplicar essa espécie em grande escala.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a embriogênese somática em *Campomanesia xanthocarpa* a partir de folhas jovens e embriões zigóticos maduros.

2.2 Objetivos específicos

- Testar diferentes tipos de explantes para a obtenção de calos e massas embriogênicas;
- Testar diferentes formulações de meios de cultura para obtenção de calos e massas embriogênicas;
- Analisar o efeito de duas auxinas e diferentes concentrações na indução de massas embriogênicas e embriões somáticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE ESTUDO

Foram utilizados dois tipos de explantes de *Campomanesia xanthocarpa*: discos foliares obtidos de plantas cultivadas *in vitro* a partir de sementes por quatro meses e embriões zigóticos maduros.

Frutos maduros de guabirobeira (Figura 30A) foram coletados de uma única árvore matriz em dezembro de 2015 e 2016 em São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba – Paraná e transportados até o Laboratório de Micropropagação Vegetal (LMV) do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde foram lavados e despulpados manualmente. Uma amostra da planta matriz foi coletada, identificada taxonomicamente por uma especialista em Myrtaceae e tombada no herbário da UFPR sob o número UPCB 91646.

As sementes coletadas em 2015 foram todas utilizadas para germinação e obtenção de plantas *in vitro*. No caso das coletadas em 2016, metade das sementes foi utilizada para germinação e obtenção de plantas e outra metade para obtenção dos embriões zigóticos maduros.

Discos foliares de um cm de diâmetro foram obtidos a partir de folhas jovens das plantas cultivadas *in vitro*, com o auxílio de um perfurador em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas. Foram eliminados o ápice e a base da folha. Foram inoculados oito discos por placa de Petri, todos os discos com a face abaxial voltada para o meio de cultura.

3.2 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes foram desinfestadas de acordo com o protocolo estabelecido por Silva (2015), utilizando a imersão em etanol (70%) durante um minuto, seguido por imersão em hipoclorito de sódio (5%) juntamente com duas

gotas de Tween 20 durante dez minutos e três lavagens com água destilada esterilizada. Além disso, foram testadas as mesmas concentrações dos agentes desinfestantes em períodos de tempo reduzidos pela metade.

3.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram testadas duas formulações de meio de cultura (ANEXO 1) para a fase de indução dos calos: meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). Para a fase de multiplicação dos calos, foi utilizado o meio WPM. Em todos os meios foram adicionados sacarose (3%) e o biocida PPM™ (0,1%). O pH foi ajustado para 5,8 com soluções de NaOH ou HCL 0,1 N antes da adição de ágar Vetec® (0,6%) e posterior autoclavagem durante 20 min a 120 °C.

Os meios foram vertidos em placas de Petri (9 x 2,5 cm), cada uma contendo 40 mL de meio. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, no escuro e com temperatura de 26 ± 2 °C.

3.4 FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS

3.4.1 A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

Foram realizados três experimentos. No primeiro, foram utilizados os meios MS e WPM adicionados de 2,4-D nas concentrações de 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 µM juntamente com um controle sem auxina. No segundo, foi utilizado apenas o meio WPM adicionado de 2,4-D nas concentrações de 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 µM. No terceiro, o meio WPM foi adicionado de Picloram (PIC) nas mesmas concentrações do experimento anterior.

Após trinta dias, foi avaliada a formação de calos, assim como a oxidação total. A cada mês, os calos foram subcultivados em novos meios de cultura frescos, totalizando quatro subcultivos (150 dias).

3.4.2 MANUTENÇÃO DE CALOS

Os calos obtidos de discos foliares na fase de indução (após o quarto subcultivo) foram transferidos para meios frescos contendo $2,5 \mu\text{M}$ de 2,4-D, $0,5 \mu\text{M}$ de BAP e 500 mg.L^{-1} de glutamina. Calos com grandes massas foram subdivididos em porções menores. Cada placa continha oito massas embriogênicas. A cada mês, foi avaliado o tamanho e aspecto dos calos e novamente as massas grandes foram divididas ou subdivididas. Posteriormente foram transferidas para meios frescos.

3.4.3 A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MATUROS

Após a desinfestação das sementes, o tegumento foi retirado e os embriões isolados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Foram inoculados cinco embriões por placa de Petri (9 x 2,5 cm), com 10 placas por tratamento.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com $0,5 \mu\text{M}$ de BAP, $3,42 \text{ mM}$ de glutamina e 2,4-D ($2,5$, $5,0$, $7,5$, $10,0$ e $12,5 \mu\text{M}$) assim como um controle sem auxina. Após trinta dias, foi avaliada a percentagem de explantes formando calos, oxidação total e percentagem de eixos embrionários germinados. A cada mês, os meios de cultura foram substituídos por meios frescos em um total de quatro subcultivos (180 dias).

3.5 FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E CONVERSÃO

As massas embriogênicas foram mantidas juntamente com os explantes nos mesmos meios de cultura e sob as mesmas condições até a formação dos embriões somáticos. A formação de embriões somáticos normais e anormais foi assincrônica e estes surgiram ao término de 180 dias.

Os embriões normais nos estádios torpedo e cotiledonar foram transferidos para meio WPM contendo 0,1% de carvão de ativado e 3% de sacarose sem reguladores vegetais. Foram cultivados sob luz fluorescente do tipo branca fria com densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16h e temperatura de 26 ± 2 °C.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os experimentos a partir de discos foliares, foram utilizados oito discos por placa em um total de 12 placas por tratamento. Já os experimentos com EZM, foram utilizados 5 explantes por placa em um total de 10 placas por tratamento. Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Para explorar os resultados das variáveis respostas (formação de calos, e oxidação) e das variáveis preditoras (meios de cultura, tipo e concentrações de reguladores vegetais), os dados foram ajustados a diferentes modelos de acordo com a distribuição das variáveis respostas. As diferenças de variável foram analisadas por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição de *Poisson* e função de ligação *logit*. As variáveis categóricas (presença/ausência) foram analisadas com distribuição binomial.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando a plataforma R, versão 3.2.5 e os pacotes *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2013), *car* (FOX e WEISBERG, 2011), *lme4* (BATES *et al.*, 2015) e *nlme* (PINHEIRO *et al.*, 2016). Os testes *post-hoc* (teste de Tukey com probabilidade de erro inferior a 0,001) foram realizados utilizando *glht* do pacote (HOTHORN *et al.*, 2016).

4. RESULTADOS

4.1 DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES

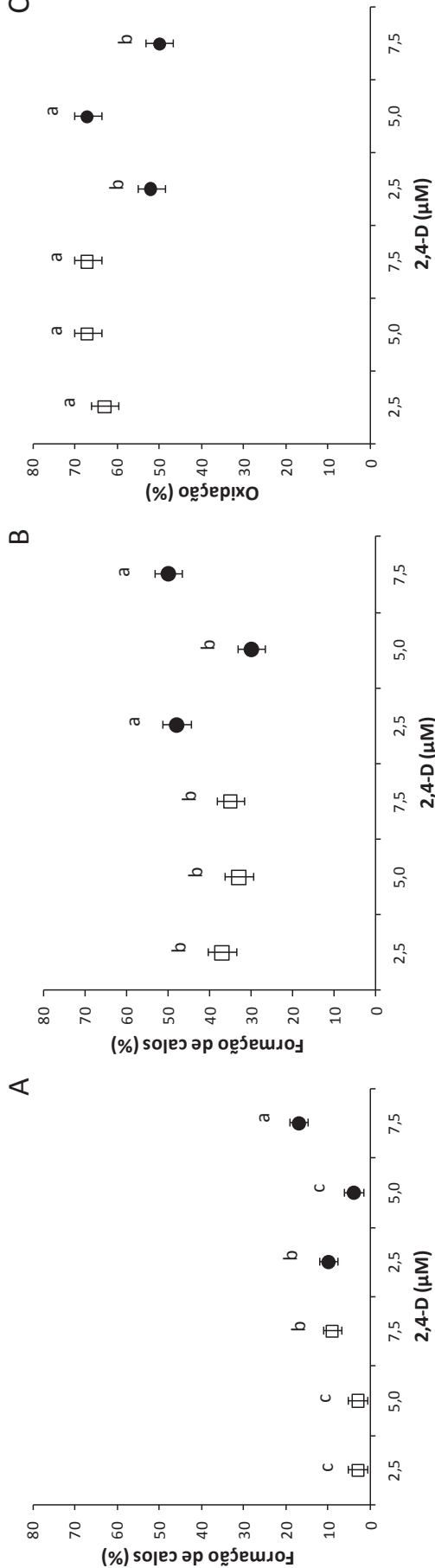
Não houve diferença para as taxas de contaminação entre os tempos de exposição das sementes aos agentes desinfestantes (X^2 12,006; G.L. 1; $p \leq 0,001$). Porém, no período completo (1 min no etanol e 10 min no NaOCl), 22% das culturas foram contaminadas apenas por bactérias, enquanto que no período reduzido foram 58% de contaminação por bactérias e fungos. Portanto, as demais desinfestações foram realizadas com o maior tempo de exposição aos agentes desinfestantes.

4.2 FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

No primeiro experimento, após trinta dias de cultivo, o meio de cultura que induziu a maior formação de calos (17%) foi o WPM suplementado com 7,5 μ M de 2,4-D (X^2 91,44; G.L. 5; $p \leq 0,001$) (FIGURA 25A). Durante este período, não houve interação entre os fatores (meios de cultura e concentração de 2,4-D: $p \geq 0,001$) para a formação de calos.

Após 150 dias de cultura, as percentagens de explantes com calos foram maiores em relação aos primeiros 30 dias de cultura em todos os tratamentos e as maiores taxas foram 48 e 50% obtidas no meio WPM suplementado com 2,5 e 7,5 μ M de 2,4-D respectivamente (X^2 69,24; G.L. 5; $p \leq 0,001$) (FIGURA 25B). Neste período de cultivo, houve oxidações dos explantes em todos os meios e a menor taxa foi de 50 e 52% nos meios WPM suplementados com 2,5 e 7,5 de 2,4-D (X^2 77,83; G.L. 5; $p \leq 0,001$) (FIGURA 25C). Houve interação entre os fatores (meios de cultura e concentração de 2,4-D: $p \geq 0,001$) para a formação de calos e oxidação.

FIGURA 25 - FORMAÇÃO DE CALOS E OXIDAÇÃO EM DISCOS FOLIARES DE *Campomanesia xanthocarpa* APÓS 30 E 180 DIAS DE CULTURA NA PRESENÇA DE 0,1% DE PPM, EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D (μM).



QUADRADO: MEIO MS; CÍRCULO: MEIO WPM. A: 30 DIAS; B-C: 150 DIAS. DADOS COM A MESMA LETRA ACIMA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018)

No segundo experimento, após 30 dias, a concentração de 2,4-D que promoveu maior formação de calos (15%) foi 7,5 μM (X^2 91,44; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 26A).

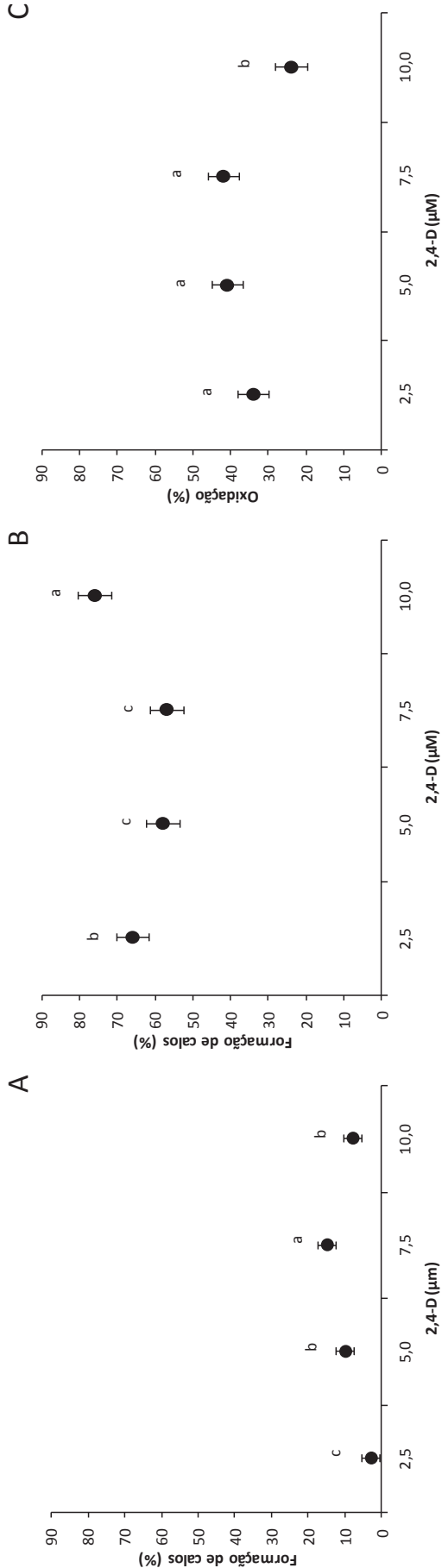
Após 150 dias de cultivo, em todas as concentrações de 2,4-D houve formação de calos acima de 50% e o valor mais alto (76%) foi obtido em 10 μM (X^2 22,29; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 26B). Neste período, foram observadas oxidações dos explantes em todos os meios de cultura, sendo a mais baixa (23%) encontrada no meio contendo 10,0 μM de 2,4-D (X^2 61,43; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 26C).

No terceiro experimento foi testado o Picloram no meio WPM. Após 30 dias de cultura, as concentrações de PIC que promoveram maior porcentagem de formação de calos foram as de 2,5 e 5,0 μM com 15 e 18%, respectivamente (X^2 57,91; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 27A). Neste período, as maiores taxas de oxidação foram 41 e 37% observadas no meio com 5,0 e 10,0 μM de PIC, respectivamente (X^2 50,32; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 27C).

Após 150 dias de cultivo, a maior taxa de formação de calos foi 44% obtida no meio com 10,0 μM (X^2 22,29; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 27B) e as maiores taxas de oxidação foram encontradas nos meios com 2,5, 5,0 e 7,5 μM de PIC com valores de 64 à 67% (X^2 68,01; G.L. 3; $p \leq 0,001$) (FIGURA 27D).

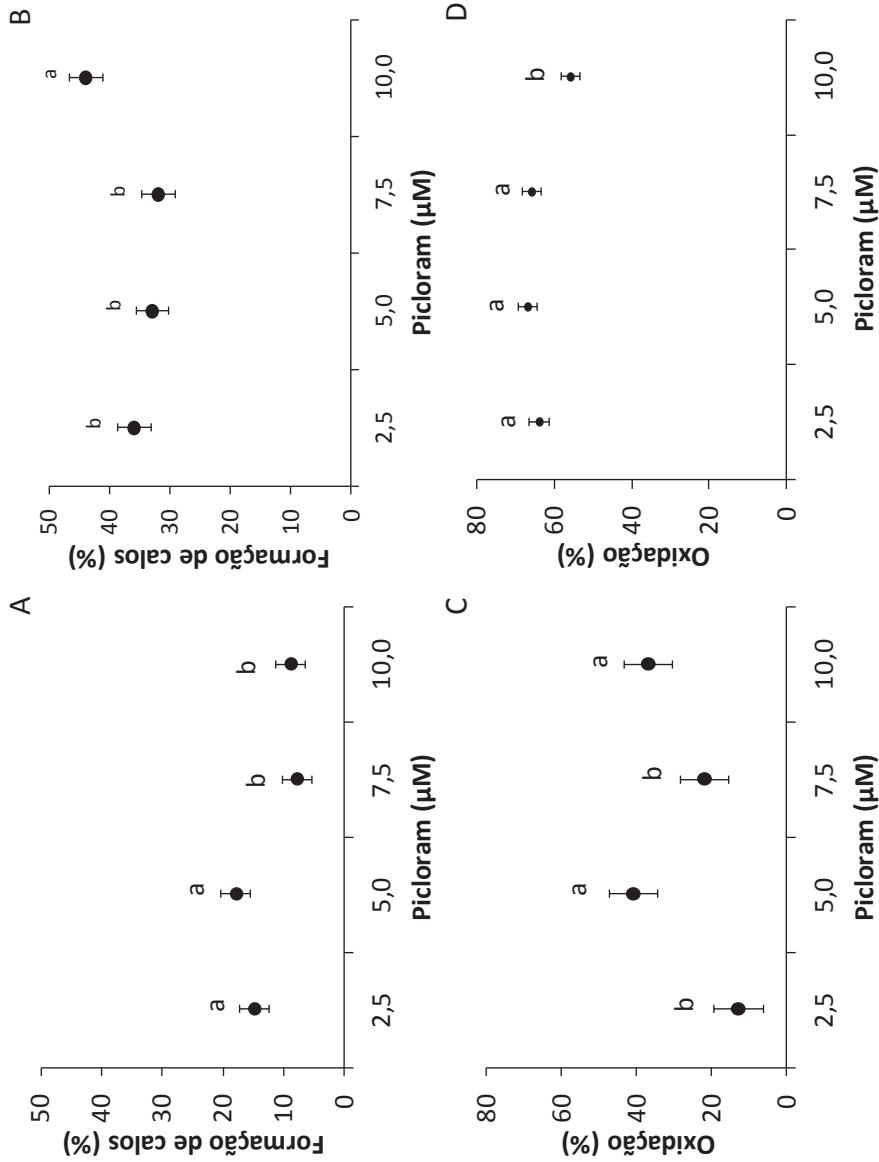
Os calos surgiram em diferentes regiões do disco foliar como nos bordos, na superfície e nas partes terminais das nervuras (FIGURA 28A, B e G). Apresentaram aparência friável (FIGURA 28D-I) ou granulosa (FIGURA 28A-C), com coloração clara (FIGURA 28A-C, D, G), castanha (FIGURA 28I) e/ou escura (Figura 28E, F e H).

FIGURA 26 - FORMAÇÃO DE CALOS E OXIDAÇÃO EM DISCOS FOLIARES DE *Campomanesia xanthocarpa* APÓS 30 (A) e 150 DIAS (B e C) DE CULTURA EM MEIO WPM ADICIONADO DE 0,1% DE PPM E DE 4 CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D



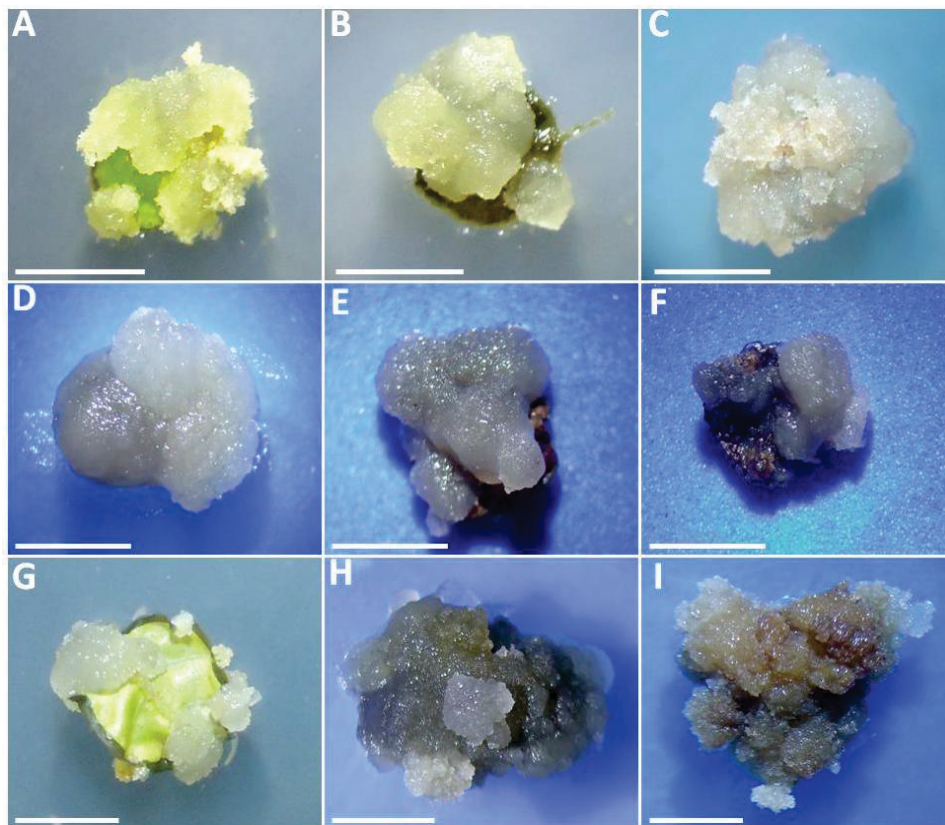
DADOS COM A MESMA LETRA ACIMA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

TABELA 27 - FORMAÇÃO DE CALOS E OXIDAÇÃO EM DISCOS FOLIARES DE *Campomanesia xanthocarpa* APÓS 30 (A e C) E 150 (B e D) DIAS DE CULTURA EM MEIO WPM ADICIONADO DE 0,1% DE PPM E DE QUATRO CONCENTRAÇÕES DE PICLORAM



DADOS COM LETRAS IGUAIS ACIMA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

FIGURA 28 - FORMAÇÃO DE CALOS EM DISCOS FOLIARES DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADOS EM DOIS MEIOS DE CULTURA SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (μM) DE 2,4-D OU PICLORAM DURANTE 90 DIAS



A-C, G-I: 2,4-D. D-F: PICLORAM. A-F: MEIO WPM; A: 2,5; B: 5,0; C: 7,5; D: 2,5; E: 5,0; F: 7,5; G-I: MEIO MS; G: 2,5; H: 5,0; I: 7,5. BARRAS: 1 CM. FONTE: O Autor (2018).

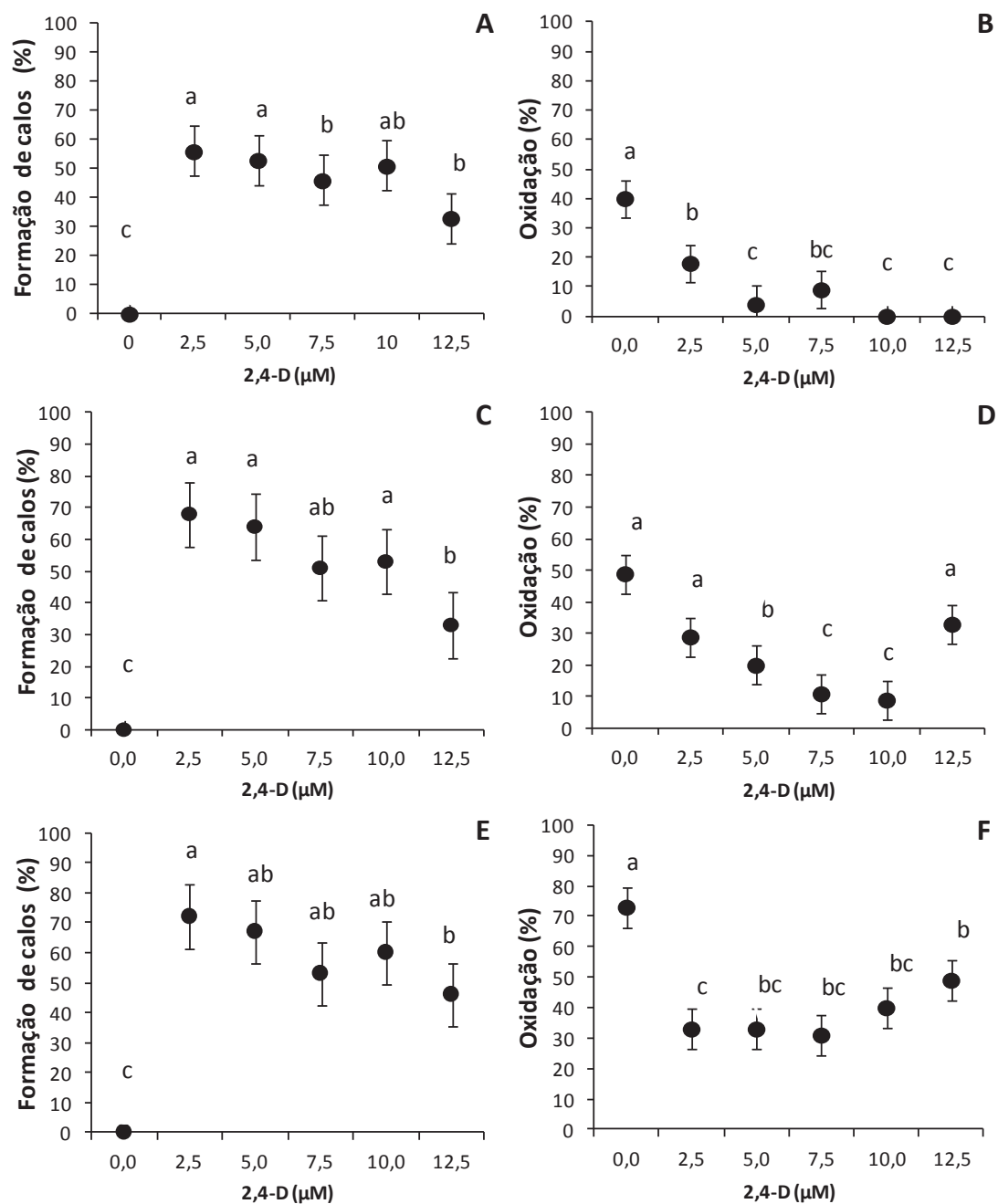
4.3 FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS

Em 30 dias de cultivo, em todos os meios de cultura WPM suplementados com 2,4-D, os explantes apresentaram formação de massas embriogênicas e os maiores valores variaram entre 46 e 68% nos meios com 2,5 a 10,0 μM de 2,4-D (X^2 23,81; G.L. 5; $p \leq 0,001$). Na concentração mais alta (12,5 μM), houve 33% de indução de massas embriogênicas (FIGURA 29A) enquanto que, no meio sem regulador, houve apenas germinação dos eixos embrionários (dados não mostrados). Neste período, a maior percentagem de oxidação dos explantes também foi encontrada no meio sem 2,4-D (X^2 21,50; G.L. 5; $p \leq 0,001$) (FIGURA 29B).

Em 60 dias de cultivo (2º. sc), todos os meios contendo 2,4-D, exceto na concentração de 12,5 μM , apresentaram os valores mais elevados de formação, variando de 51 a 68% (X^2 23,81; G.L. 5; $p \leq 0,001$) (FIGURA 29C). As oxidações ocorreram em todos os meios e foram mais acentuadas nos meios sem 2,4-D e com esta auxina nas concentrações de 2,5 e 12,5 μM sendo os valores entre 29 a 49% (FIGURA 29D).

Em 90 dias (3º. sc), os resultados foram semelhantes aos obtidos em 30 dias onde, em todos os meios contendo 2,4-D houve indução de massas embriogênicas com valores variando entre 53 e 72%. Porém, novamente em 12,5 μM os valores foram mais baixos em relação as demais concentrações. (FIGURA 29E). Neste período, em todos os meios houve oxidação dos explantes, a mais elevada (73%) sendo observada no meio sem 2,4-D (FIGURA 29F). Após 90 dias, todos os explantes apresentaram resposta e as percentagens de formação, bem como de oxidação, permaneceram constantes durante o restante do cultivo (180 dias).

FIGURA 29 – FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS E OXIDAÇÃO EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS DE *Campomanesia xanthocarpa* DURANTE 90 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM ADICIONADO DE 0,1% DE PPM E CINCO CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D.



A,B: 30; C,D: 60; E,F: 90 DIAS. DADOS COM A MESMA LETRA ACIMA NÃO DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY COM $P \leq 0,001$. BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA \pm ERRO PADRÃO. FONTE: O Autor (2018).

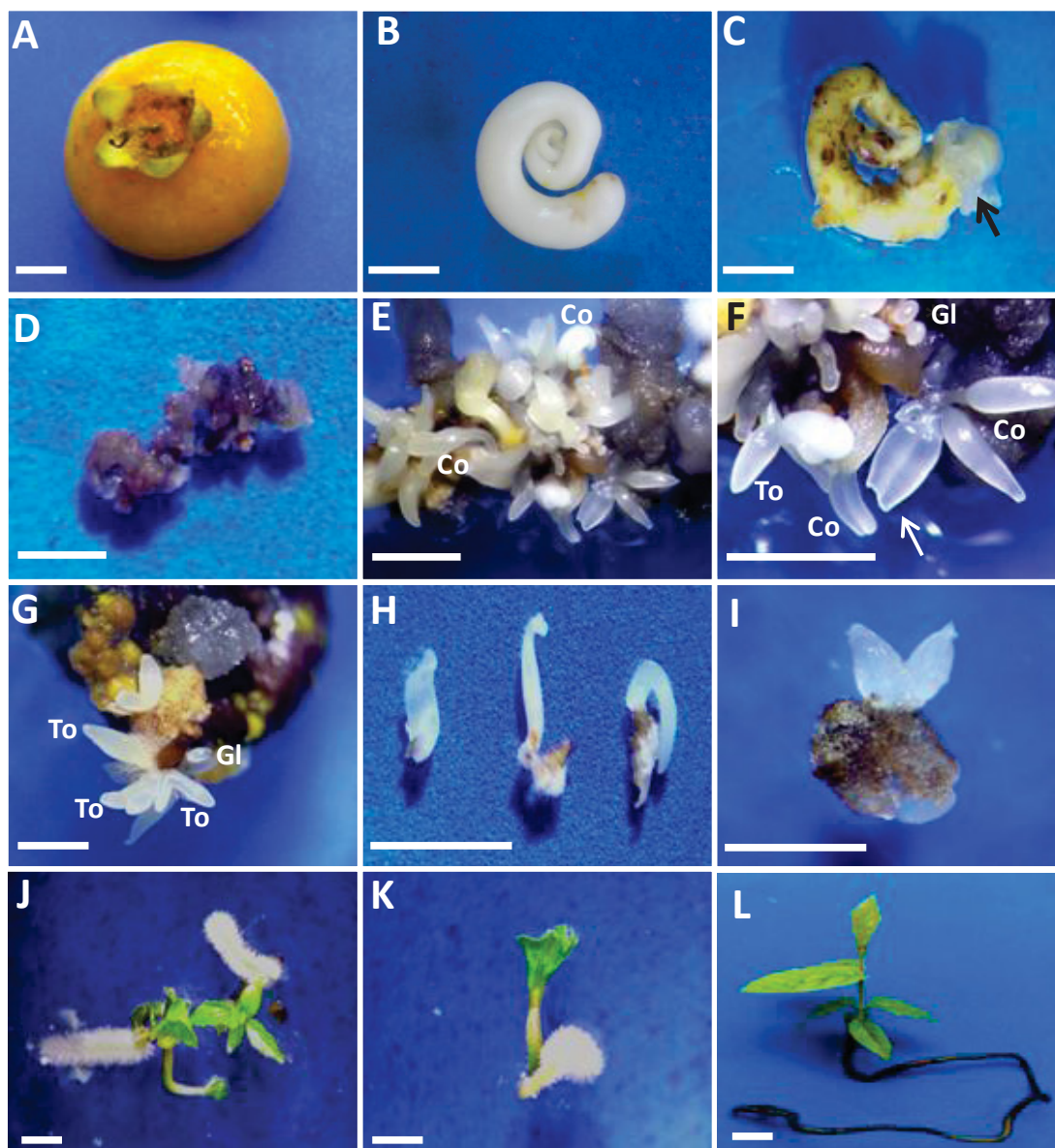
4.4. FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E CONVERSÃO EM PLANTAS

Após sete dias de cultura, o volume dos EZM inoculados nos meios de cultura contendo 2,4-D (FIGURA 30C) aumentou. Massas embriogênicas friáveis e com aspecto translúcido surgiram em diferentes regiões do explante, mais comumente na base (FIGURA 30C) e na superfície do EZM.

Os ES surgiram em 8% (4/50) das massas embriogênicas cultivadas em meio WPM suplementado com 7,5 μ M de 2,4-D após 180 dias. Os mesmos apresentaram diferentes tamanhos e estádios de desenvolvimento (FIGURA 30D-F). Foram obtidos 30 ES; no entanto, 50% deles (15) eram anormais, como cotilédones fusionados e ausência de sistema radicial (FIGURA 30F eH).

Os ES transferidos para meio de conversão e cultivados na presença de luz, foram todos convertidos após sete dias (FIGURA 30J-K). Todos os ES normais converteram em plântulas normais (FIGURA 30L).

FIGURA 30 - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS DE *Camponesia xanthocarpa*.



A: FRUTO MADURO; B: EMBRIÃO ZIGÓTICO MADURO UTILIZADO COMO EXPLANTE; C: FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOÊNICAS APÓS 7 DIAS; D: MASSA EMBRIOGÊNICA; E-I: EMBRIÕES SOMÁTICOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS APÓS 180 DIAS; H-I: EMBRIÕES SOMÁTICOS ANORMAIS; J-K: PLÂNTULAS NORMAIS OBTIDAS APÓS 15 DIAS; L: PLANTA NORMAL APÓS 90 DIAS. SETAS: PRETA: MASSA EMBRIOGÊNICA; BRANCA: EMBRIÃO ANORMAL COM COTILÉDONES FUSIONADOS. ESTÁDIOS: Gl: GLOBULAR; To: TORPEDO; Co: COTILEDONAR. BARRAS: 0,5 CM. FONTE: O Autor (2018).

5. DISCUSSÃO

5.1 DESINFESTAÇÃO

Durante a desinfestação dos explantes com etanol seguido de hipoclorito de sódio, ambos os períodos de exposição foram eficientes para promover a instalação das culturas assépticas. No entanto, quando o tempo foi reduzido, houve maior porcentagem de contaminação sem diferença estatística em relação ao período completo.

Semelhantemente, na desinfestação de explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, trinta segundos de exposição ao etanol 70% juntamente com quinze minutos de exposição ao hipoclorito de sódio 5% foram eficazes para a remoção dos microorganismos e prevenção da contaminação *in vitro* (MOURA *et al.*, 2017).

Estes períodos de exposição são comumente relatados na cultura *in vitro* de diferentes espécies de *Eucalyptus* e podem variar de acordo com o agente desinfestante, porém, entre os mais usados, assim como foi neste trabalho, destacam-se o etanol e hipoclorito de sódio (TRUEMAN *et al.*, 2018).

Embora ambos os períodos tenham sido efetivos, recomendamos o período completo de exposição (30 s no etanol e 5 min no NaOCl) devido ao maior número de explantes preservados e maior quantidade de material.

5.2 FORMAÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS

Houve formação de calos e massas embriogênicas tanto no meio de cultura MS quanto no WPM, porém a maior porcentagem foi encontrada no meio WPM. Estudos de embriogênese somática em Myrtaceae ainda são escassos e isto dificulta a comparação com os resultados obtidos no presente estudo; porém, de acordo com a bibliografia consultada, nenhum protocolo desenvolvido até o momento utilizou o meio WPM para a indução e demais etapas da embriogênese somática nesta família. O meio mais utilizado para

Myrtaceae é o MS, como observado em muitas espécies de *Eucalyptus* (TRUEMAN, *et al.*, 2018, MOURA, *et al.*, 2017 e CORREDOIRA, *et al.*, 2011), em *Acca sellowiana* (CRUZ *et al.*, 1989), *Myrtus communis* (PARRA e AMO-MARCO, 1998 e CANHOTO *et al.*, 1999) e *Psidium guajava* (RAI *et al.*, 2007).

Outras formulações de meios também foram utilizadas, como o meio NN para *Myrciaria aureana* (MOTOIKE, *et al.*, 2007) e, em protocolos mais recentes, para *A. sellowiana*, o meio LPM (STEFANELLO *et al.*, 2005, PESCADOR *et al.*, 2008 e FRAGA *et al.*, 2013).

O meio WPM foi desenvolvido para espécies lenhosas. Entre as principais diferenças na sua formulação em relação aos demais meios utilizados em Myrtaceae, estão a concentração mais baixa de nitrogênio, maior concentração de cálcio e tiamina e a ausência de cobalto e iodo (LLOYD e McCOWN, 1980). Em nossos estudos anteriores, o WPM foi o meio que permitiu maior desenvolvimento de explantes na micropropagação por multiplicação de gemas axilares em *Campomanesia xanthocarpa*. Semelhantemente este meio mostrou-se o mais adequado para a formação de massas embriogênicas nesta espécie. Desta forma, este trabalho apresenta pela primeira vez sucesso na utilização do meio WPM para a embriogênese somática em uma espécie de Myrtaceae.

5.2.1 EXPLANTES

Discos foliares responderam mais lentamente que embriões zigóticos e formaram apenas calos. Poucos estudos com tecidos foliares foram realizados para a embriogênese somática em Myrtaceae até o momento. O uso de explantes foliares apresenta maior vantagem para a clonagem massal devido ao genótipo dos embriões somáticos obtidos a partir deste material serem idênticos a planta-mãe (TRUEMAN *et al.*, 2018). Por outro lado, acredita-se que algumas espécies são recalcitrantes para a regeneração a partir deste

tecido, restringindo-se apenas a embriões zigóticos, como para *A. sellowiana* (STEFANELLO et al., 2005) e *Eucalyptus* sp. (TRUEMAN et al., 2018).

No entanto, massas embriogênicas e embriões somáticos foram obtidos com sucesso em explantes foliares de *Eucalyptus saligna* x *E. maidenii*, espécie que anteriormente era descrita como recalcitrante (CORREDOIRA et al., 2017). Portanto, em relação aos dados apresentados neste trabalho, não podemos descartar a possibilidade de obter embriogênese somática em *C. xanthocarpa* a partir de discos foliares, sendo necessários mais estudos.

Massas embriogênicas e embriões somáticos de guabirobeira foram obtidos a partir de embriões zigóticos maduros. Da mesma forma, embriões zigóticos maduros foram utilizados na embriogênese somática de outras Myrtaceae como *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1989, PESCADOR et al., 2008 e FRAGA et al., 2013), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007). Embriões zigóticos imaturos foram usados como explantes em *M. communis* (PARRA e AMO-MARCO, 1998) e *Psidium guajava* (RAI et al., 2007).

Embriões zigóticos têm sido comumente utilizados para a embriogênese somática em diversas espécies devido a fácil desinfestação e por se tratar de um tecido com células jovens e em divisão, o que possibilita respostas mais rápidas e positivas para a obtenção de massas embriogênicas e embriões somáticos (VON ARNOLD et al., 2002; FÉHER, 2015 e TRUEMAN et al., 2018). Neste sentido, recomendamos a utilização deste tipo de explante para obter rapidamente respostas positivas.

5.2.2 PICLORAM E 2,4-D

Entre as auxinas testadas, o picloram, em todas as suas concentrações, promoveu apenas formação de calos, esta em menor percentagem e maior taxa de oxidação que o 2,4-D. Em Myrtaceae, a utilização desta auxina é pouco comum, no entanto, nos protocolos para *Acca sellowiana* (STEFANELLO et al.,

2005), *Myrtus communis* (CANHOTO *et al.*, 1999) e diferentes espécies de eucalipto (CORREDOIRA *et al.*, 2015, MOURA *et al.*, 2017 e TRUEMAN *et al.*, 2018), o picloram apresentou respostas positivas e nestes casos foram obtidas massas embriogênicas, embriões somáticos e plantas convertidas com sucesso.

O 2,4-D foi a auxina que promoveu maior percentagem de formação de massas embriogênicas com menor taxa de oxidação. Da mesma forma, esta auxina foi utilizada na maioria dos estudos em Myrtaceae como *Acacia sellowiana* (PESCADOR *et al.*, 2008; FRAGA *et al.*, 2013), *Eucalyptus* sp. (TRUEMAN *et al.*, 2018), *Myrtus communis* (PARRA e AMO-MARCO, 1998), *Myrciaria aureana* (MOTOIKE *et al.*, 2007) e *Psidium guajava* (RAI *et al.*, 2007). Além da maior utilização do 2,4-D em Myrtaceae, esta auxina é amplamente utilizada em diversos estudos de embriogênese somática de várias espécies, sendo considerada como a mais comum (JIMÉNEZ *et al.*, 2005).

O 2,4-D é um composto sintético análogo as auxinas que possui efeito altamente estressante para as células e, por isso, é comumente utilizado para promover a competência celular e a formação das células embriogênicas durante a fase de indução. Em resposta ao estresse causado pelo 2,4-D, ocorre o remodelamento da cromatina, a expressão gênica, reestruturação e divisão das células (FÉHER, 2015). Embora esta auxina seja eficiente em muitos protocolos, seu mecanismo de ação a nível molecular não é totalmente conhecido e respostas indesejadas como alterações epigenéticas, variação somaclonal e formação de embriões anormais, que conseqüentemente são incapazes de converterem-se em plântulas, são relatadas em várias espécies (VON ARNOLD *et al.*, 2002; JIMÉNEZ, 2005).

Aparentemente, o aspecto dos calos obtidos na presença de ambas as auxinas foi semelhante, com variação entre massas mais granulosas e quebradiças, brancas a amareladas e translúcidas e friáveis. Ao decorrer dos cultivos foi observado que as massas embriogênicas tornavam-se mais amareladas, passando para tons castanhos e marrons escuros. Da mesma

forma, as massas embriogênicas de *Eucalyptus saligna* x *E. maidenii* apresentavam aspecto friável e translúcido, mas tornaram-se marrons e, em alguns casos mais drásticos, necróticos e desagregados durante o decorrer das culturas (CORREDOIRA *et al.*, 2015). Este efeito pode ser devido ao constante aumento das massas e à oxidação em resposta a condições desfavoráveis do meio de cultura como presença de reguladores vegetais e ausência ou excesso de nutrientes minerais.

5.3 EMBRIÕES SOMÁTICOS

Embriões somáticos aparentemente surgiram pela via indireta de forma assincrônica a partir de embriões zigóticos maduros cultivados em meio WPM suplementado com 7,5 uM de 2,4-D. Atualmente, não existe um padrão definido para a formação dos embriões somáticos em Myrtaceae e, para algumas espécies, foi pela via direta (MOTOIKE *et al.*, 2007, FRAGA *et al.*, 2013) e em outras, indireta (PARRA e AMO-MARCO, 1998, CORREDOIRA *et al.*, 2015). De acordo com a literatura consultada, a formação assincrônica de embriões somáticos é um padrão para as espécies de Myrtaceae.

Foram obtidos embriões somáticos normais e anormais, com cotilédones fusionados e ausência de meristema/sistema radicial. Tais anormalidades já foram descritas para outras espécies de Myrtaceae. Para *Acca sellowiana* foi relatada alta tendência para a formação de embriões somáticos anormais e entre as anormalidades mais comuns está a fusão dos embriões e cotilédones e ausência dos meristemas apicais (PESCADOR *et al.*, 2008). Em *Myrtus communis*, houve embriões somáticos anormais com raízes mal formadas (PARRA e AMO-MARCO, 1999). Em *Myrciaria aureana*, cotilédones mais largos, embriões múltiplos, fusionados e reduzidos foram observados (MOTOIKE *et al.*, 2007).

A formação de embriões anormais pode ser explicada pelo efeito das auxinas durante o processo de indução e multiplicação das massas embriogênicas. Nos exemplos citados, todos os explantes foram cultivados na

presença de 2,4-D, composto que pode causar alterações epigenéticas e morfologias anormais como discutido acima. Uma alternativa para minimizar este efeito pode ser a redução do período de exposição dos explantes ao 2,4-D (JIMÉNEZ, 2005; FÉHER, 2015).

5.4 CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM PLANTAS

A fase de maturação dos ES não foi necessária neste estudo e todos os ES normais converteram em plantas normais quando cultivados em meio WPM sem reguladores, com carvão ativado e na presença de luz.

Ao contrário, a maioria dos protocolos de embriogênese somática para Myrtaceae, a fase de maturação dos ES é necessária para a posterior fase de conversão. Meios de cultura sem reguladores foram utilizados para *Eucalyptus saligna* x *E. maidenii* com conversão após seis semanas (CORREDOIRA *et al.*, 2015) e para *Myrciaria aureana* com 20% de embriões convertidos após duas semanas (MOTOIKE *et al.*, 2008). Em outras espécies, para promover a conversão foi necessário utilizar meios suplementados com diferentes reguladores. Ácido giberélico (GA₃) e BAP foram utilizados para *M. communis* e *Acca sellowiana* (CANHOTO *et al.*, 1999; PARRA e AMO-MARCO, 1999; FRAGA *et al.*, 2013). As respostas dos embriões somáticos variam muito entre as espécies e, devido a isto, os meios de conversão apresentam grande diferença nas suas composições. A conversão pode ocorrer em meios com ou sem reguladores, adicionados de diferentes vitaminas, com a presença ou não de carvão ativado (VON ARNOLD, 2002). Porém, em muitos casos, a taxa de conversão é muito baixa ou nula. Nestes casos é necessário promover melhorias nas etapas anteriores à formação do embrião somático para que ele se desenvolva completamente e seja capaz de converter normalmente em planta (JIMÉNEZ, 2005).

6. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver um protocolo de embriogênese somática utilizando embriões zigóticos maduros de guabirobeira até a fase de conversão em plantas.

Dos explantes utilizados, o disco foliar apresentou apenas formação de calos sem a diferenciação em embriões somáticos durante todo o cultivo. Já a calogênese foi mais rápida a partir dos embriões zigóticos e houve formação de embriões somáticos.

O meio de cultura que proporcionou maior formação de massas embriogênicas e com baixa oxidação dos explantes foi o WPM. A auxina que promoveu a maior taxa de indução de calos foi o 2,4-D recomendando a concentração de 2,5 μM .

Embriões somáticos assincrônicos normais e anormais foram obtidos. Entre as anormalidades estavam a ausência de sistema radicial e cotilédones fusionados. Todos os ES normais converteram em plantas quando cultivados na presença de luz.

Estudos futuros são necessários para promover maior número de embriões somáticos, descrever a fase de aclimatização das plantas e realizar estudos anatômicos para compreender melhor a embriogênese somática nesta espécie.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA de SP. Cerrado: aproveitamento alimentar. **Planaltina: Embrapa-CPAC**. v.1, p. 188, 1998.

CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration of Myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; IBARRA, M.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, v. 35, n. 6, p. 678-690, 2015.

CRUZ, S. G.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v. 66, p. 263-270, 1989.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: **Somatic embryogenesis**. Springer Berlin Heidelberg. p. 85-115. 2005.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – Stress induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p.385-1402, 2015.

FERREIRA, I. C.; GUIMARÃES, A. G.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; FILHO, J. D. S.; GUIMARÃES, D. A. S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 100-108, 2013.

FRAGA, H. P. F.; AGAPITO-TENFEN, S. T.; CAPRESTANO, C. A.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Comparative proteomic analysis of off-type and normal phenotype somatic plantlets derived from somatic embryos of *Feijoa (Acca sellowiana)* (O. Berg) Burret). **Plant Science**, v. 210, p. 224-231. 2013.

GEORGE, E. F.; HALL, M A.; GEERT-JAN, K.; **Plant propagation by tissue culture**. 3ªed., v.1, The Background. 2008.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**. Santa Maria. n. 39, p. 1606-1613, 2009.

HOTHORN, T; BRETZ, F; WESTFALL, P; HEIBERGER, R. M; SCHUETZNMEISTER, A; SCHEIBE, S. Package multcomp: Simultaneous inference in General Parametric Models. R package version 3.2.5., p. 1-128, 2016. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/multcomp.pdf>. Acesso em: 21 de março de 2017.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis (review). **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society** v. 30, p. 421-427, 1980.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Camponesia adamantium* Camb.- Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M.C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, L. C; XAVIER, A; CRUZ, A. C. F; GALLO, R; GATTI, K. C; MIRANDA, N. A; OTONI, W. C. Effects of explants type, culture media and Picloram and DICAMBA growth regulators on induction and proliferation os somatic embryogenesis in *Eucalytus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, n. 41, v. 5, p. 1-10, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PARRA L e AMO-MARCO J. B. Effect of plant growth regulators and basal media on *in vitro* shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. **Biologia Plantarum**. v. 38, n. 2, p. 161-168, 1996.

PAVAN, F. R; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PESCADOR, R.; KERBAUY, B. G.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

RAI, K. M.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.

SCUTTI, M.B; ZANETTE, F. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**, v.1, n 12, p. 75-82, 2000.

SILVA, R. C. da; DEGENHARDT-GOLDBACH, J; QUOIRIN, M. Cultura *in vitro* de calos e quantificação de compostos fenólicos em gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg). **Dissertação de mestrado**,

Universidade Federal do Paraná, Programa de pós-graduação em Botânica, Curitiba, Paraná, 2016.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>. Acesso em: 29 Jun. 2016.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. H.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P.; Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa, *Feijoa sellowiana* Berg. **Scientia Horticulturae**, n. 105, p. 117-120, 2005.

TRUEMAN, J. S.; HUNG, C. O.; WENDLING, J. Tissue culture in *Corymba* and *Eucalyptus*. **Forests**, n. 84, v. 9, p. 2-42, 2018.

VIECELI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECELI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, n. 234, p. 85-92, 2014.

VINAGRE, A. S.; RONNAU, A. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U.; WILLAND, E. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 5, p. 870-874, 1980.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Review: Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a guabirobeira por indução de brotações múltiplas. O uso do biocida PPM™ foi eficaz para a prevenção de contaminações, porém seu efeito na multiplicação e no enraizamento precisa ser melhor estudado.

BAP adicionada ao meio de cultura WPM proporcionou as taxas de multiplicação mais altas, mas elas não aumentaram ou aumentaram pouco durante os subcultivos. Essa etapa pode ser aprimorada com períodos mais prolongados de exposição dos explantes às citocininas durante os subcultivos ou através do cultivo em meio líquido.

No enraizamento dos brotos, o meio WPM foi o que permitiu maior taxa de formação de raízes sem oxidações e necrose dos explantes. A auxina AIB (4,9 μ M) promoveu maior percentagem de enraizamento que os meios sem auxinas, suplementados com ANA ou com concentrações mais elevadas de AIB.

A aclimatização necessita de futuros estudos para promover aumento nas taxas de sobrevivência das plantas micropropagadas.

Os teores de pigmentos fotossintéticos e os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foram maiores nas plantas cultivadas *ex vitro* e nas aclimatizadas. Isto indica que as plantas *in vitro* apresentam menor potencial da atividade do PSII possivelmente devido a presença de sacarose nos meios de cultura. A aclimatização em condições com menor PPFD foi eficiente resultando em maior rendimento quântico do PSII nas plantas aclimatizadas.

Técnicas de embriogênese somática podem ser aplicadas a esta espécie visto que conseguimos a indução de calos embriogênicos e formação de embriões somáticos com conversão em plantas normais. Estudos sobre este processo visando melhorias no protocolo e a obtenção de maior número de embriões somáticos são necessários e fortemente recomendados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA de SP. Cerrado: aproveitamento alimentar. **Planaltina: Embrapa-CPAC**. v.1, p. 188, 1998.
- ALVES E.O.; MOTA J.H.; SOARES TS.; VIEIRA M.C.; SILVA C.B. Ethnobotanical survey and medicinal plants characterization in forest fragments in Dourados – MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BAKER, R. N. ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, n. 403, v. 55, p. 1607 – 1621, 2014.
- BATES, D; MAECHLER, M; BOLKER, B; WALKER, S. Fitting Linear Mixed–Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, p. 1–48. 2015.
- BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L.M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 385-389, 2004.
- BLANDO, F; ONLU, S; COLELLA, G; KONCZAK, I. Plant regeneration from immature seeds of *Eugenia myrtifolia* Sims. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, n. 49, p. 388-395, 2013.
- BOLAR, J. P; NORELLI, J. L; ALDWINCKLE, H. S; HANKE, V. An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. **Horticulturae Science**, n, 37, p. 1251–1252, 1998.
- BRESTIC, M; ZIVCAK, M; KALAJI, H. M; CARPENTIER, R; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photosystem II thermostability *in situ*: environmentally induced acclimation and genotype-specific reactions in *Triticum aestivum* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 57, p. 93-105, 2012.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration of Myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.
- CARVALHO, C. L; OSÓRIO, M. L; CHAVES, M. M; AMÂNCIO, S. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chesnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 67, p. 271-280, 2001.
- CHANDRA, R.; BAJPAI, A.; GUPTA, S.; TIWARI, R. K. Embryogenesis and plant regeneration from mesocarp of *Psidium guajava* L. (guava). **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 246-248, 2004.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; IBARRA, M.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult

Eucalyptus globulus and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, v. 35, n. 6, p. 678-690, 2015.

CRUZ, S. G.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v. 66, p. 263-270, 1989.

CUENCA, B. SANCHÉZ, C; ALDREY, A; BOGO, B; BLANCO, B; CORREA, B; VIDAL, N. Micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*) in liquid medium in a continuous immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 131, p. 307-320, 2017.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. **Micropropagation: Technology and Applications**. Springer, Países Baixos. 1ª ed. P. 1-13, 1991.

DEELL, J. R; TOLVONEN, P. M. A. Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology. Kluwer Academic Publishers, p. 79-115, 2003.

DEWIR Y. H.; SINGH, N.; MNGOMEZULU, S.; OMAR, A. M. K. Micropropagation and detection of important triterpenes in *in vitro* and field grown plants of *Syzygium cordatum*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 14, p. 3078-3083, 2011.

DUTRA, F. L.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. A. Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

FAISAL, M.; ANIS, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 125-132, 2009.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: **Somatic embryogenesis**. Springer Berlin Heidelberg. p. 85-115. 2005.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – Stress induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p.385-1402, 2015.

FERREIRA, I. C.; GUIMARÃES, A. G.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; FILHO, J. D. S.; GUIMARÃES, D. A. S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 100-108, 2013.

FLORES, R.; BRONDANI, D. J.; CEZAROTTO, V. J.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Micropropagation and β-ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 210-217, 2010.

FRAGA, H. P. F.; AGAPITO-TENFEN, S. T.; CAPRESTANO, C. A.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Comparative proteomic analysis of off-type and normal phenotype somatic plantlets derived from somatic embryos of *Feijoa (Acca sellowiana)* (O. Berg) Burret). **Plant Science**, v. 210, p. 224-231. 2013.

FREIRE, G.C; GARDIN, J.P.P; BARATTO, S.C; VIEIRA, R.L; WERNER, S.S. Micropropagation's complete protocol of red araquá (*Psidium cattleianum*, Myrtaceae) from germinated seeds *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n.2, p. 234-251, 2018.

FOX, J; WEISBERG, S. Functions and datasets to accompany. An R Companion to Applied Regression, Second Edition, **Thousand Oaks** CA: Sage. 2011.

GEORGE, M.W; TRIPEPI, R.R. Plant Preservative Mixture™ can affect shoot regeneration from leaf explants of chrysanthemum, european birch and rhododendron. *HortScience*, v. 36, n.4, p. 768-769, 2001.

GEORGE, E. F.; HALL, M A.; GEERT-JAN, K.; **Plant propagation by tissue culture**. 3ªed., v.1, The Background. 2008.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**. Santa Maria. n. 39, p. 1606-1613, 2009.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LÉON, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucra* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**. Santa Maria. n. 22, p. 207-214, 2012.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. World Checklist of Myrtaceae, **Royal Botanic Gardens**, 2008.

HOTHORN, T; BRETZ, F; WESTFALL, P; HEIBERGER, R. M; SCHUETZMEISTER, A; SCHEIBE, S. Package multcomp: Simultaneous inference in General Parametric Models. R package version 3.2.5., p. 1-128, 2016. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/multcomp.pdf>. Acesso em: 21 de mar de 2017.

HUH, S.Y; LEE, K.J; KIM, I.J; KANG, G.B; LEE, K.Y. Effect of biocide addition on plantlet growth and contamination occurrence during the *in vitro* culture of blueberry. **Journal of Plant Biotechnology**. v. 42, p.111-116, 2015.

HUYLENBROECK, J M. VAN; PIQUERAS, A; DEBERGH, P. C. The evolution of photosynthetic capacity and antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. **Plant Science**, n. 155, p. 59-66, 2000.

IBARAKI, Y. Evaluation of photosynthetic capacity in micropropagated plants by image analysis. In: **Plant Tissue Culture Engineering**, GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Ed.) vol. 6, Springer, Países Baixos, p. 15-29, 2008.

JALA, A; CHANCHULA, N. Effect of BA and NAA on micropropagation of tea tree (*Melaleuca alternifolia* Cheel) In vitro. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 47, n.1, p. 37-43, 2014.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis (review). **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.

KADLECEK, P; TICHÁ, I; HASEL, D; CAPKOVÁ, V; SCHAFER C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, n. 161, p. 695 – 701, 2001.

KALAJI, H, M; SCHANSKER, G; LADLE, J. R; GOLTSEV, V; BOSA, K; ALLAKHVERDIEV, S. I; BUSSOTTI, M. B. F; CALATAYUD, A; BROWSKI, P. D; ELSHEERY, N. I; FERRONI, F; GUIDI, L; HOGEWONING, S. W; JAJOO, A; MISRA, A. N; NEBAUER, S. G; PANCALDI, S; PENELLA, C; POLI, D; POLLASTRINI, M; ROMANOWSKA-DUDA, Z, B; RUTKOWSKA, B; SERÔDIO, J; SURESH, K; SZULC, W; TAMBUSI, E; YANNICCARI, M; ZIVCAK, M. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis research**, n. 122, v. 2, p.121-158, 2014.

KALAJI, H. M; CARPENTIER, R; ALLAKHVERDIEV, S. I; BOSA, K. 2012. Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 112, p. 1–6, 2012.

KHAN, V. S.; HAUSMAN, J. F.; RAO, K. R. Clonal multiplication of *Syzygium alternifolium* (Wight) Walp, through mature nodal segments. **Silvae Genética**, v.48, n.1, p.45-50, 1999.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; OLIVEIRA, M. F.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. T.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J; VIECELI, P. R. N. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, p. 299-305, 2010.

KUMAR, K.; RAO, I.U. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in *ex vitro* conditions – A review. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants**. v. 2, p.271-283, 2012.

LANDO, A. P.; WOLFART, M. R.; FERMINO, P. C. P.; SANTOS, M. Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 219-225, 2016.

LEE, D. W; OBERBAUER, S. F; JHONSON, P; KRISHNAPILAY, B; MANSOR, M; MONHAMED, H; YAP, K. S. Effects of irradiance and spectral quality on

leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American journal of botany**, n. 87, v. 4, p. 447-455, 2000.

LEMOS-FILHO, J. Fotoinibição em três espécies do Cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenteria* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 1, v.1, p. 45-50, 2000.

LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983.

LIMA, D. F; GOLDENBERG, R; SOBRAL, M. O gênero *Campomanesia* no (Myrtaceae) no Paraná. **Rodriguésia**. n. 62, v. 3, p. 683-693. 2011.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society** v. 30, p. 421-427, 1980.

MALDONADO-MAGANÃ, A.; BERNABÉ-ANTONIO, A.; SALCEDO-PÉREZ, E.; CRUZ-SOSA, F. *In vitro* regeneration of *Calophyllum brasiliense* Cambess: A valuable medicinal tree. **African Journal of Biotechnology**, vol. 14, p. 2831-2835, 2015.

MARTINAZZO, G. E; ANISE, S; WANDSCHEER, A. L. D; PASTORINI, P. H. Efeito do sobreamento sobre o crescimento inicial e teor de clorofila de *Eugenia uniflora* Lin. (Pitanga), Família Myrtaceae. **Revista brasileira de biociências**, n. 5, v. 2, p. 167-164, 2007.

MAXWELL, K.; JOHNSON, N. G. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Camponesia adamantium* Camb.- Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MIELKE, S. M; SCHAFFER, B. Photosynthetic and growth responses of *Eugenia uniflora* seedlings to soil flooding and light intensity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 2, p. 113-121, 2010.

MISHRA, M.; CHANDRA, R.; PATI, R.; BAJPAI, A. 2007. Micropropagation of guava (*Psidium guava* L.). **Acta Horticulturae**, v. 735, p. 155-158, 2007.

MIYAZAKI, J; TAN, B.H; ERRINGTON, S.G. Erradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrid* using Plant Preservative Mixture (PPM™). **Plant Celular, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 365-372, 2010.

MOREIRA, S. T. M.; SALVAGNINI, L. E.; SANTOS, E.; SILVA, V. Y. A.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO R. C. L. R. Antidiarrheal activity of *Campomanesia xanthocarpa* fruit. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, n. 5, p. 528-531, 2011.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M.C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, L. C; XAVIER, A; CRUZ, A. C. F; GALLO, R; GATTI, K. C; MIRANDA, N. A; OTONI, W. C. Effects of explants type, culture media and Picloram and DICAMBA growth regulators on induction and proliferation os somatic embryogenesis in *Eucalytus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, n. 41, v. 5, p. 1-10, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, C. L.; VARGAS, P. D.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess.) efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde**, v.3, n. 2, p. 20-26, 2008.

NITSCH, J. P; NITSCH, C. Haploids plants from pollen grains. **Science**, n. 163, p. 85-87, 1969.

OKSANEN, J; BLANCHET, F.G; KINDT, R; LEGENDRE, P; MINCHIN, P.R; O'HARA, R.B. Vegan: Community Ecology Package. R package version 3.2.5. Disponível em: <<http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>> Acesso em: 3 de Março de 2016.

OLIVEIRA, S. L.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439 – 453, 2013.

OLIVEIRA, S. L.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439 – 453, 2013.

OLTRAMARI, A. C; DAL VESCO, L. L; PEDROTTI, E. L; DUCROQUET, J. H. H; NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000

QUOIRIN, M; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.437-442, 1977.

PARRA L e AMO-MARCO J. B. Effect of plant growth regulators and basal media on *in vitro* shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. **Biologia Plantarum**. v. 38, n. 2, p. 161-168, 1996.

PARRA L e AMO-MARCO J.B. Secondary Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Myrtle (*Myrtus communis* L.), **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 325-330. 1998.

PAVAN, F. R; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). **Química Nova**. v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PELEGRINI, L. L.; RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H. S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**. n. 10, p. 1527-1533, 2011.

PESCADOR, R.; KERBAUY, B. G.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

PINHEIRO, J; BATES, D; DEBROY, S; SARKAR, D. and R-CoreTeam. Nlme: Linear and 745 Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.2.5., 1–128. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>> Acesso em: 16 de Ago de 2016.

PORRA, R, J; THOMPSON, W. A; KRIEDEMANN. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384-394, 1989.

POSPISILOVÁ, J.; TICHÁ, I. KADLECEK, P.; HASEL, D. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**. v. 42, p. 481-497, 1999.

POSPISILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HASEL, D.; SEMORÁDOVÁ, S. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂, concentration and abscisic acid (a review). **Acta Horticulturae**. v. 784 p. 29-38, 2007.

POSPISILOVÁ, J.; SINKOVÁ, H; HASEL, D; BATKOVÁ, P. Effects of abscisic acid on photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco. **Biologia Plantarum**. n. 53, v.1, p. 11-20, 2009.

PREMKUMAR, A; MERCADO, J.A; QUESADA, M. A. Effects of in vitro tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. **Journal of Plant Physiology**, n. 158, p. 835-840, 2001.

PROENÇA, C. *et al.* In MARTINELLI G. e MORAES M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1º ed. Rio de Janeiro. Andrea Jakobsson: Instituto de

Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Centro Nacional de Conservação da Flora, Parte II: Myrtaceae, p. 714-743, 2013.

QUOIRIN, M; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.437-442, 1977.

RAI, K. M.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.

RAVEN, P.H; EVERT, R. F; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7^a. ed. Coord. Trad. J.E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSKI, L.; GUERRA, M. G. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peróba-Rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**. v. 9, n. 4, p. 517-524, 2005.

ROCHA, da S. C.; QUORIN, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabrelea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa – MG n. 31, p. 43-50, 2007.

ROSSATO, M; SCHUMACHER P. V; NETTO, A. P. C; SOUZA, G. C; REIS, E. F; STEIN, C. V. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* CAMB. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, n. 2, v. 11, p 70-77, 2015.

ROSS, S.; GRASSO, R. *In vitro* propagation of ‘Guayabo del país’ (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret). **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**. v. 4, n. 1, p. 83-87, 2010.

ROSSATO, M; SCHUMACHER P. V; NETTO, A. P. C; SOUZA, G. C; REIS, E. F; STEIN, C. V. Multiplication and *in vitro* rooting of *Campomanesia adamantium* CAMB. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, n. 2, v. 11, p 70-77, 2015.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE de, L. A.; SOUZA de, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**. vol. 7 n. 2, p. 117-123, 2001.

SCUTTI, M.B; ZANETTE, F. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. **Scientia Agraria**. V.1, n 12, p. 75-82, 2000.

STEFANELLO, S; DAL VESCO, L. L; DUCROQUET, J. P. H. J; NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissue of *Feijoa sellowiana* Berg. **Scientia Horticulturae**, N. 115, P. 117-120, 2005.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. *In*: PAPAGEORGIOU, G.; GOVINDJEE

(eds) **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**, advances in photosynthesis and respiration. Springer, Dordrecht, pp 321–362. 2004.

SILVA, P. R. D. da.; RISPOLI, R. G.; MINOZZO, M. M.; JOBIM, L. H.; JUNGES, M.; STEFENON, V. M. A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and micropropagation. **Annals of Forest Research**. v. 57, n. 1, p. 39-45, 2014.

SILVA, R. C. da; DEGENHARDT-GOLDBACH, J; QUOIRIN, M. Cultura *in vitro* de calos e quantificação de compostos fenólicos em gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg). **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Programa de pós-graduação em Botânica, Curitiba, Paraná, 2016.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 29 Jun. 2016

SOUZA V. C. e LORENZI H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III**. 1ª edição, Nova Odessa, Instituto Plantarum, 650 páginas, 2012.

TRUEMAN, J. S; HUNG, C. O; WENDLING, J. Tissue culture in *Corymba* and *Eucalyptus*. **Forests**, n. 84, v. 9, p. 2-42, 2018.

TURAN, S; KUMAR, S; CORNISH, K. Photosynthetic response of *in vitro* guayule plants in low and high lights and the role of non-photochemical quenching in plant acclimation. **Industrial Crops and Products**, n. 54, p. 266-271, 2014.

UNEMOTO, L. K.; FARIA de, R. T.; MENEGUCE, B.; ASSIS, A. M. de. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore- (Gesneriaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy**. , vol. 28, p. 503-506, 2006.

VIECELI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECELI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**. n. 234, p. 85-92, 2014.

VINAGRE, A. S.; RONNAU, A. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U.; WILLAND, E. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, n. 5, p. 870-874, 1980.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Review: Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

XIAO, Y. NIU, G; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 105, p. 149-158, 2011.

**ANEXO 1 – CONCENTRAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES DE
DIFERENTES FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA (mg.L⁻¹)**

Sais	LPm	MS	QL	WPM
NH₄NO₃	1200	1650	400	400
Ca(NO₃)₂.4H₂O	-	-	-	556
K₂SO₄	-	-	-	990
KNO₃	1900	1900	1800	-
CaCl₂.2H₂O	180	440	-	96
Ca(NO₃)₂.4H₂O	-	-	1200	-
KH₂PO₄	340	170	270	170
H₃BO₃	0,63	6,2	12	6,2
Na₂MoO₄.2H₂O	0,025	0,25	0,25	0,25
KI	0,75	0,83	0,08	-
CoCl₂.6H₂O	0,0025	0,025	0,025	-
MgSO₄.7H₂O	370	370	360	370
MnSO₄.H₂O	2,2	16,9	0,75	22,3
ZnSO₄.7H₂O	4,05	8,6	8,6	8,6
CuSO₄.5 H₂O	0,0025	0,025	0,025	0,25
FeSO₄.7H₂O	14	27,8	27,8	27,8
Na₂.EDTA	19	37,3	37,3	37,3

**ANEXO 2 – CONCENTRAÇÃO DE VITAMINAS E COMPOSTOS
ORGÂNICOS EM DOIS MEIOS DE CULTURA, EXPRESSA EM mg.L⁻¹**

	MS	WPM
Ácido Nicotínico	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5
Tiamina-HCl	0,1	1,0
Glicina	2,0	2,0
Mio-inositol	100	100

ANEXO 3 - SCRIPTS PARA MODELOS LINEARES GENERALIZADOS (GLM)

Exemplo: SFB em relação aos Meios de Cultura

```
> meiosjean <- read.table ("meios.txt", header = TRUE)

>library (car)

>library (nlme)

>library (lme4)

>library (ggplot2)

>attach (meiosjean)

>str (meiosjean)

>nullmeiosjean <-glm (SFB~Meio, family=poisson, data=meiosjean)

>summary (nullmeiosjean)

>Anova (nullmeiosjean)

>Tukey (nullmeiosjean)
```